

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**ÁREA INTEGRADA**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN REALIZADO EN EL LABORATORIO DE  
CULTIVO DE TEJIDOS EN LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.**



**RONY ESTUARDO DEL CID ILLESCAS**

**GUATEMALA, MARZO DE 2009**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**TRABAJO DE GRADUACIÓN REALIZADO EN EL LABORATORIO DE**  
**CULTIVO DE TEJIDOS EN LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA**  
**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, GUATEMALA.**

**PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE**  
**AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.**



**POR**  
**RONY ESTUARDO DEL CID ILLESCAS**  
**EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO**  
**INGENIERO AGRÓNOMO**  
**EN**  
**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**EN EL GRADO ACADÉMICO DE**

**LICENCIADO**

**GUATEMALA, MARZO DE 2009**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**RECTOR**

**Lic. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA**

<b>DECANO</b>	<b>MSc. FRANCISCO JAVIER VÁSQUEZ VÁSQUEZ</b>
<b>VOCAL PRIMERO</b>	<b>Ing. Agr. WALDEMAR NUFIO REYES</b>
<b>VOCAL SEGUNDO</b>	<b>Ing. Agr. WALTER ARNOLDO REYES SANABRIA</b>
<b>VOCAL TERCERO</b>	<b>MSc. DANILO ERNESTO DARDON ÁVILA</b>
<b>VOCAL CUARTO</b>	<b>Br. RIGOBERTO MORALES VENTURA</b>
<b>VOCAL QUINTO</b>	<b>Br. MIGUEL ARMANDO SALAZAR DONIS</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>MSc. EDWIN ENRIQUE CANO MORALES</b>

**GUATEMALA, MARZO de 2009**

**Guatemala, Marzo de 2009**

**Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala**

**Honorables miembros:**

**De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración, el trabajo de Graduación realizado en el laboratorio de cultivo de tejidos en la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.**

**Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,**

**Atentamente,**

**Rony Estuardo del Cid Illescas**

**“ID Y ENSEÑAD A TODOS”**

## **ACTO QUE DEDICO**

**A:**

**DIOS Y LA VIRGEN MARÍA:** Por guiarme, bendecirme, acompañarme, darme las herramientas necesarias y por darme la sabiduría a lo largo de mi vida y carrera para alcanzar esta meta.

**MIS PADRES:** A ustedes mamá Ana y papá Luis, por guiarme, darme su amor y ejemplo, su apoyo, su comprensión, su ayuda, sus cuidados, por estar siempre a mi lado, por ser la fortaleza, por su esmero día con día para que no me faltara nada, sin ustedes no hubiera podido realizar mis metas, esto es una pequeña muestra de todo el amor que siento por ustedes, los quiero muchísimo, gracias.

**MI HERMANA Y HERMANOS:** A Paty, por ser mi amiga, por tu cariño, tu apoyo, tus consejos, y a ustedes Edgar, Luis y Eddy, por ser mis amigos, mis consejeros, por su compañía y apoyo, los quiero mucho a los cuatro.

**A MIS SOBRINOS:** Esperando ser un buen ejemplo en el futuro profesional que a ellos les espera.

**MIS TIOS, PRIMOS Y DEMAS FAMILIA:** Por sus alegrías, consejos, apoyos y por su cariño. Dios los bendiga.

**A MIS AMIGOS Y AMIGAS:** A todos en general por compartir cada momento de mi carrera y de mi vida, son un gran apoyo, gracias por estar siempre en las buenas y malas.

## **TESIS QUE DEDICO**

**A:**

**COLEGIO LOYOLA Y MARIANO Y RAFAEL CASTILLO CORDOVA:** Por sus enseñanzas y guiarme por un camino de armonía, amor, trabajo y amistad, y por ser la base de mis conocimientos.

**LA FACULTAD DE AGRONOMÍA:** Por las facilidades brindadas para la presente investigación y a mi formación profesional.

**LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA:** Por ser mi casa de estudios, de la cual me siento muy orgulloso de pertenecer.

**MIS ASESORES:** Dr. David Monterroso, por sus valiosas y oportunas sugerencias al presente estudio y por toda la ayuda brindada, al Ing. Alfredo Cabrera, por su valiosa ayuda, asesoramiento en el proceso de investigación y por proporcionarme las herramientas de campo necesarias en esta investigación.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
DIAGNOSTICO DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES..	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	5
3.1 Antecedentes.....	5
3.2 Unidad Ejecutora.....	6
3.3 Misión.....	6
3.4 Ubicación.....	6
3.5 Infraestructura.....	7
3.6 Recursos Humanos.....	7
3.7 Equipo.....	7
3.8 Reactivos.....	10
4. Conclusiones .....	11
5. Recomendaciones.....	11
5.1 Bibliografía.....	12
<b>CAPÍTULO II</b>	
RESPUESTA A LA GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA <i>Vanilla planifolia</i>	
Andrews.....	15
6. INTRODUCCIÓN.....	16
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
8. MARCO TEÓRICO.....	19
8.1 Marco Conceptual.....	19
8.1.1 Propagación <i>in vitro</i> .....	19
8.1.2 Importancia del cultivo de tejidos.....	20

8.1.3	Ventajas del cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	21
8.1.4	Desventajas del cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	21
8.1.5	Pasos que conlleva a la micropropagación.....	22
8.1.6	Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> .....	22
8.1.7	Almacenamiento del germoplasma .....	23
8.1.8	Aspectos importantes de la conservación <i>in vitro</i> .....	23
8.1.9	Elementos importantes en la conservación <i>in vitro</i> .....	24
8.1.10	Explante.....	26
8.1.11	Propagación <i>in vitro</i> a partir de semillas.....	27
8.1.12	Métodos asépticos.....	27
8.1.13	Componentes de los medios de cultivo.....	28
8.1.14	Reguladores de crecimiento.....	30
8.1.15	Aplicación de los reguladores de crecimiento al cultivo <i>in vitro</i> .....	36
8.1.16	Elaboración del medio de cultivo.....	39
8.1.17	Desinfección de la semilla de orquídea.....	40
8.1.18	Siembra de la semilla de orquídea.....	41
8.1.19	Condiciones de incubación.....	42
8.1.20	Influencia del nitrato de plata en la multiplicación <i>in vitro</i> .....	42
8.2	Marco Referencial.....	43
8.2.1	Características botánicas de <i>Vanilla planifolia</i> Andrews.....	44
8.2.2	Ubicación del experimento.....	44
9.	OBJETIVOS.....	45
9.1	Objetivo general.....	45
9.2	Objetivo específico.....	45
10.	HIPÓTESIS.....	45
11.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
11.1	Reactivos y materiales.....	46
11.2	Cristalería y equipo.....	46
11.3	Medios de cultivo.....	46
11.4	Material vegetal.....	51
11.5	Propagación <i>in vitro</i> .....	52



11.6	Incubación de la semilla.....	54
11.7	Descripción de los tratamientos.....	55
11.8	Descripción de la unidad experimental.....	56
11.9	Factores a evaluar.....	56
11.10	Variables de respuesta.....	57
11.11	Análisis de la información.....	58
12.	Resultados.....	59
13.	Discusión de resultados.....	67
14.	Conclusiones.....	69
15.	Recomendaciones.....	70
16.	Bibliografía.....	71

### CAPITULO III

#### SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS

VEGETALES.....	74
17. INTRODUCCIÓN.....	75
18. MANTENIMIENTO DE BANCO CLONAL DE DOS VARIEDADES DE AGUACATE .....	76
18.1 Objetivo general .....	76
18.1.2 Objetivo específico.....	76
18.2 Materiales y métodos.....	76
18.3 Resultados y discusión.....	78
18.4 Conclusiones.....	81
18.5 Recomendaciones.....	81
19. MANTENIMIENTO DE BANCO CLONAL DE CRISANTEMO ( <i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat).....	82
19.1 Objetivo general.....	82
19.1.2 Objetivo específico.....	82
19.2 Materiales y métodos.....	82
19.3 Resultados y discusión.....	84

19.4 Conclusiones.....	87
19.5 Recomendaciones.....	87
20. IMPLEMENTACIÓN DE UN ACLIMATIZADOR.....	88
20.1 Objetivo general.....	88
20.1.2 Objetivo específico.....	88
20.2 Materiales y métodos.....	88
20.3 Resultados y discusión.....	89
20.4 Conclusiones.....	89
20.5 Recomendaciones.....	89
ANEXOS.....	90

## ÍNDICE DE FIGURAS i

FIGURA 1. Autoclave.....	8
FIGURA 2. Campana de flujo laminar.....	9
FIGURA 3. Horno de convección.....	9
FIGURA 4. Reactivos utilizados.....	10
FIGURA 5. Deficiencias de espacio en el laboratorio.....	12
FIGURA 6. Deficiencias de espacio en el laboratorio.....	12
FIGURA 7. Semilla de vainilla germinada <i>in Vitro</i> .....	20
FIGURA 8. Corte longitudinal vaina de vainilla.....	23
FIGURA 9. Semilla de vainilla germinada lista para almacenar.....	26
FIGURA 10. Siembra de semillas de vainilla para la germinación <i>in vitro</i> .....	41
FIGURA 11. Muestras vegetales de <i>Vanilla planifolia</i> .....	52
FIGURA 12. Selección de la vaina de <i>Vanilla planifolia</i> .....	53
FIGURA 13. Siembra de semillas de <i>Vanilla planifolia in vitro</i> .....	54
FIGURA 14. Tratamientos utilizados en la germinación de vainilla.....	56
FIGURA 15. Semillas germinadas vrs días de germinación.....	61
FIGURA 16. Días de germinación y número de semillas germinadas a los 145 días.....	63
FIGURA 17. Días de germinación hasta los 205 días.....	65
FIGURA 18. Fases del desarrollo in vitro de vitroplántulas de <i>Vanilla planifolia</i> .....	66
FIGURA 19. Clon de aguacate Hass trasplantado.....	79
FIGURA 20. Clones de aguacate Both 8 <i>in Vitro</i> .....	79
FIGURA 21. Cuarto de incubación.....	80
FIGURA 22. Enraizamiento de aguacate Hass.....	80
FIGURA 23. Crisantemo variedad polar.....	84
FIGURA 24. Crisantemo variedad standar.....	85

FIGURA 25. Cuarto de Incubación.....	85
FIGURA 26. Enraizamiento de Crisantemo variedad Polar.....	86
FIGURA 27. Enraizamiento de Crisantemo variedad Standar.....	86

## ÍNDICE DE CUADROS ii

Cuadro 1. Equipo a disposición del laboratorio de cultivo de tejidos.....	8
Cuadro 2. FODA del laboratorio de cultivos de tejidos.....	13
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de la vainilla .....	43
Cuadro 4. Componentes de macro nutrientes Murashige y Skoog.....	47
Cuadro 5. Componentes micronutrientes A del medio nutritivo Murashige y Skoog.....	48
Cuadro 6. Componentes micronutrientes B del medio nutritivo Murashige y Skoog.....	48
Cuadro 7. Descripción de los tratamientos utilizados en la germinación de brotación en cada medio de cultivo.....	55
Cuadro 8. Concentraciones de reguladores de crecimiento utilizados en la germinación in vitro de <i>Vanilla planifolia</i> .....	56
Cuadro 9. Resultados obtenidos en la germinación de las semillas de <i>Vanilla Planifolia</i> Andrews a los 58, 60, 65, 66, 70, 73 y 75 días después de sembradas las semillas.....	60
Cuadro 10. Resultados obtenidos en la germinación de las semillas de <i>Vanilla Planifolia</i> Andrews a los 118, 120, 126, 135 y 145 días después de sembradas las semillas.....	62
Cuadro 11. Resultados obtenidos en la germinación de las semillas de <i>Vanilla Planifolia</i> Andrews a los 178, 180, 186, 195 y 205 días después de sembradas las semillas.....	64
Cuadro 12. Componentes de macro nutrientes Murashige y Skoog en 1000 ml.....	77
Cuadro 13. Componentes Micro nutrientes A del medio nutritivo	

Murashige y Skoog.....	78
Cuadro 14. Componentes de macro nutrientes Murashige y Skoog en 1000 ml.....	83
Cuadro 15. Componentes Micro nutrientes A del medio nutritivo Murashige y Skoog.....	83
Cuadro 16. Descripción de los componentes del medio de cultivo MS.....	90

## RESUMEN

La tasa de reproducción de la vainilla en su estado natural es demasiado baja ya que necesita a polinizadores específicos para poder reproducirse y por ende no lo hace en mayor cantidad respecto a las necesidades de los productores y dejarle a la naturaleza la reproducción es un riesgo para el futuro ya que se perderían las variedades criollas, es por esto que se está implementando el cultivo *in Vitro* como una alternativa reproductiva en la cual se pueden llegar a alcanzar tasas de multiplicación desde 1:100 hasta 1:1000, también se tiene controlado el ambiente de crecimiento, libre de patógenos que afectan naturalmente a la reproducción de la vainilla.

Para el cultivo *in Vitro* se emplean técnicas especializadas para que la semilla de vainilla germine de forma sexual, proporcionándole todos los nutrimentos en un medio artificial y dándole todas las condiciones necesarias como temperatura, humedad, luz, entre otros para su reproducción y desarrollo.

La presencia de fenoles en la germinación de la semilla de vainilla fue cero, lo cual indica que no existió oxidación en el proceso de germinación, el resultado de la contaminación de la semilla fue de 0.05%, este es un margen aceptable dentro de la investigación y no es significativa en los resultados.

A pesar de que se encuentran bajo condiciones controladas, las variables de respuesta demuestran que el proceso de germinación de semillas de vainilla es muy complejo ya que el mayor porcentaje nos lo dio en 73% y el periodo de germinación (tiempo en días) se observó a los 58 donde inició la germinación.

**CAPÍTULO I**  
**DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES**  
**DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS**  
**DE GUATEMALA (Agosto 2005 a Mayo 2006).**



## **1. INTRODUCCIÓN**

El laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala responde a las actividades de docencia, capacitación, e investigación, cooperando así con el desarrollo de la actividad docente e investigativa.

Siendo el laboratorio de cultivo de tejidos un laboratorio que asiste a estudiantes, docentes, e investigadores, se realizó el presente diagnóstico del laboratorio con el fin de establecer el estado actual de sus funciones, la organización, los recursos físicos y humanos con los que cuenta para la ejecución y creación de protocolos.

Estableciéndose la situación del centro de diagnóstico mediante un FODA (cuadro No. 2), se emiten recomendaciones, para iniciar con una serie de procesos que se deben ejecutar para mejorar la calidad de atención a personas o usuarios del mismo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar el diagnóstico del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, describir las necesidades de docencia, capacitaciones, e investigaciones.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Determinar las deficiencias y las necesidades que se presentan en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.
- ❖ Establecer las posibles soluciones para las mejoras del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, para fortalecer el desarrollo académico e investigación.
- ❖ Definir las áreas de trabajo con que cuenta el laboratorio en base a los recursos humanos y físicos.
- ❖ Establecer los puntos críticos en los cuales se debe de reestructurar para la formación de un laboratorio de reconocimiento nacional e internacional.

### **3. LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES**

#### **3.1 Antecedentes**

El laboratorio de cultivo de tejidos vegetales se inició como parte del curso de cultivo de tejidos del pensum de estudio de año del 1,982, según la propuesta fue creado con el fin de docencia, sin embargo a través del tiempo el laboratorio fue adaptándose para la realización de investigaciones, cambiando así el objetivo principal.

En el pensum de estudio de 1998, el curso de cultivo de tejidos vegetales fue excluido del programa de estudio por lo que el laboratorio, al no existir un curso teórico paso a ser un laboratorio de utilidad para la investigación.

Sin embargo a pesar de que cuenta con equipo clave para efectuar estudios científicos, el espacio no es apto para realizarlos a gran magnitud o dar algún servicio requerido por alguna empresa privada o Gubernamental.

En Guatemala el servicio de laboratorio de propagación de plantas u otros servicios relacionados con cultivo de tejidos, están limitados a instituciones estatales y privadas, en tanto, que la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala es un centro de formación de profesionales del área con personal calificado para realizar estudios de carácter científico y cuenta con el laboratorio de cultivo de tejidos, el cual presta sus servicios de forma no lucrativa, representando un gran beneficio para el agro guatemalteco.

La importancia del Laboratorio de Cultivo de Tejidos dentro de la Universidad de San Carlos de Guatemala y para la sociedad guatemalteca, es capacitar a los estudiantes en los aspectos de reproducciones *in vitro* y que comprendan la necesidad de clonar plantas que en algún ambiente no controlado como a campo abierto sería más difícil de reproducir o de obtener más clones de las mismas en menor tiempo.

### **3.2 Unidad Ejecutora**

La sub área de propagación de plantas, área Tecnológica de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### **3.3 Misión**

El laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales es un laboratorio que se utiliza para la docencia e investigación con enfoque al agro guatemalteco en todos los niveles, coadyuvando al desarrollo y la investigación agrícola, proporcionando la aplicación adecuada de la tecnología para el manejo de plantas.

### **3.4 Ubicación**

El laboratorio de cultivo de tejidos se encuentra en el campus central de la ciudad universitaria zona 12 Ciudad de Guatemala, Facultad de Agronomía edificio T8 tercer nivel en el salón c – 16.

### **3.5 Infraestructura**

El laboratorio cuenta con equipo necesario para la investigación, se reciben muestras vegetales, cuenta con un área de lavado, área de pesaje (balanza analítica), área de siembra (campana de flujo laminar) área de incubación.

Para el funcionamiento del laboratorio se cuenta con los siguientes servicios:

- ❖ Electricidad
- ❖ Agua potable
- ❖ Teléfono,
- ❖ Internet.

### **3.6 Recursos Humano**

Profesores titulares y auxiliares de la sub área de propagación de plantas, así como el personal de laboratorio y secretaria de la sub área, actualmente la sub área se encuentra a cargo del Ing. Agr. Eduardo Pretzancin, y el encargado de laboratorio es el Ing. Agr. Domingo Amador, también se cuenta con la asistencia de estudiantes para la realización de tesis, con fines de investigación.

### **3.7 Equipo**

El laboratorio de cultivo de tejidos C-16 cuenta con el equipo descrito en el Cuadro No 1 a continuación:

No.	Equipo
4	Estereoscopios
1	Refrigeradora
1	Incubadora
2	Potenciómetro
2	Campanas de flujo laminar
2	Autoclaves
1	Horno de convección
1	Microondas
1	Balanza monoplaneo
	Cristalería, instrumental

Cuadro 1. Equipo a disposición del laboratorio de cultivo de tejidos



FIGURA 1. Autoclave



FIGURA 2. Campana de flujo laminar



FIGURA 3. Horno de convección.

### 3.8 Reactivos

Para la ejecución de las diversas actividades se utilizan diversos tipos de reactivos, medios de cultivo y cristalería, pudiéndose mencionar entre los más comunes el agar - agar, sacarosa, sulfato de amonio, sulfato ferrosos, nitrato de amonio, molibdato de sodio, además existe cristalería utilizada comúnmente como beackers, erlenmeyers, probetas, tubos de ensayo etc.



FIGURA 4. Reactivos utilizados.



#### **4. Conclusiones**

- ❖ El laboratorio de cultivo de tejidos vegetales cuenta con cuatro áreas para poder realizar trabajos específicos: área de pesaje, área de esterilización, área de transferencia, área de incubación.
- ❖ El laboratorio cuenta con material valioso *in vitro* como banco de germoplásma de aguacate, de crisantemo, etc., esto de acuerdo a los proyectos de investigación realizados y/o que se estén realizando en el mismo.
- ❖ Se realizó un FODA (Cuadro No. 2) para poder determinar las partes más críticas dentro del laboratorio

#### **5. Recomendaciones**

- ❖ Debería implementarse áreas más grandes y específicas para realizar trabajos de forma más profesional y que den validez a los resultados para así poder certificar el laboratorio y que inicie actividades a beneficio de la población guatemalteca.
- ❖ Elaboración de documentos de los estudios realizados tanto a nivel de estudiantes como de investigación para hacerlos públicos anualmente y así tener validez en los trabajos de investigación realizados y también para poder darlos a conocer.
- ❖ Implementar el servicio a empresas privadas.
- ❖ Establecer un costo módico para poder sufragar gastos y cubrir las necesidades para hacer progresar el laboratorio.



FIGURA 5. Deficiencias de espacio en el laboratorio



FIGURA 6. Deficiencias de espacio en el laboratorio

**Cuadro No. 2 FODA del laboratorio de cultivo de tejidos.**

<b>FORTALEZAS</b>	<b>DEBILIDADES</b>	<b>OPORTUNIDADES</b>	<b>AMENAZAS</b>
Promueve la tecnología y la ciencia en la Agronomía	Falta de recursos económicos para la elaboración de nuevos proyectos	Que los estudiantes de la Facultad de Agronomía de la USAC se vean interesados en la investigación.	De laboratorios privados que mejoren el servicio y la atención al agro guatemalteco.
Promueve el desarrollo y avances en cultivos de importancia económica y de difícil desarrollo.	Falta de personal que trabaje en los proyectos, propuestas e investigaciones nuevas	Desarrollo de proyectos con la misma facultad y con otras para solucionar problemas agronómicos en el campo.	Que no se tenga el presupuesto para desarrollar los proyectos que se propongan.
Tiene personal altamente calificado para los trabajos de cultivos in vitro que se promueven en el laboratorio	Falta de motivación para la aprobación de nuevos proyectos e investigaciones en las diferentes áreas.	Apoyo de otras instituciones no gubernamentales tales como Organizaciones Internacionales, CONCYT, SENACYT.	Que por parte de la USAC ya no se siga trabajando en proyectos de desarrollo científico y técnico.
Es un laboratorio calificado que vela por el beneficio de la agricultura.	Falta de herramientas de trabajo dentro del laboratorio.	Nuevos financiamiento para la aprobación de proyectos con instituciones no gubernamentales.	

## 5.1 Bibliografía

1. Cabrera, A. 2006. Información general del Laboratorio de cultivo de tejidos-USAC (entrevista). Guatemala, USAC. s.p.
2. Herrera H, JG; Barreras S, A. 2002. Manual de procedimientos, análisis estadístico de experimentos pecuarios. México, Editorial Mexicana de Impresos. 117 p.
3. Rainforest, US. 2002. Medios de cultivo para tejidos vegetales *in vitro* (en línea). US. Consultado 15 mayo Disponible en [geocities.com/rainforest/andes/3026/medios.htm](http://geocities.com/rainforest/andes/3026/medios.htm)

**CAPÍTULO II**  
**INVESTIGACIÓN**

**RESPUESTA A LA GERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA *Vanilla planifolia***  
**Andrews**

## 6. INTRODUCCIÓN

Según Dressler y Chase (1995) la vainilla (*Vanilla spp*), es nativa de los bosques húmedos subtropicales cálidos de Meso América (13), se encuentra en forma silvestre y algunas veces cultivada en huertos familiares; raramente en plantaciones comerciales, siendo la *Vanilla planifolia* Andrews la más cultivada aunque actualmente también se cultivan otras especies. Estas están sufriendo una alta erosión genética, debido a la extracción inmoderada y principalmente a la deforestación según el Informe del Estado Mundial de los Bosques (FAOM por sus siglas en Inglés, 1997); citado por Maldonado, Talvico y Noor (1999); en un periodo de 5 años se perdió en el país casi el 10% de la cobertura forestal (27). Guatemala cuenta con 3,390 Há de bosque, y para el año 2010 se estima una reducción del 85% de cobertura boscosa (6).

La tecnología del cultivo *in Vitro* es ampliamente utilizada en la propagación de especies vegetales y en especial de orquídeas, por lo tanto constituye una alternativa reproductiva con tasas de multiplicación desde 1:100 a 1:1000, con la cual pueden obtenerse propágulos libres de patógenos ( bacterias, hongos etc.).

La vainilla es una planta que presenta baja polinización debido a que debe existir relación con polinizadores específicos, pertenecientes a la familia Meliponidea y una vez terminada la polinización se forma un fruto dehiscente en forma de vaina conteniendo alrededor de 3,000 semillas, de las cuales sólo unas pocas germinarán ya que para ello es necesaria la presencia de una micorriza llamada endomicorriza orquidioide o de ovillo, la vainilla es dependiente de esta micorriza en estado juvenil, pero una vez que la planta crece y logra fotosintetizar se independiza de esta micorriza (2), por esta razón la tasa de reproducción de la vainilla en su estado natural es demasiado baja respecto a las necesidades de los productores y por ende dejarle a la naturaleza la reproducción es un riesgo para el futuro y conservación de la planta de vainilla.

Derivado de lo anterior se considera que la técnica del cultivo de semilla de vainilla *in vitro* proporcionará una alternativa exitosa para la propagación de la vainilla ya que la disponibilidad de material vegetal se incrementa sin detrimento del material parental; sin embargo, es necesario realizar estudios acerca de la aplicación de esta técnica.

## 7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente estudio contribuirá con el desarrollo y empleo de técnicas que propicien a la propagación sexual de las semillas de *Vanilla planifolia* Andrews; se pretende con este trabajo adaptar la tecnología de propagación *in vitro* a la germinación de la vainilla; lo cual puede incrementar el número de plantas, esto constituye una alternativa en cuanto a la propagación de la vainilla, puesto que la disponibilidad de material vegetal se incrementa sin detrimento del recurso natural.



## **8. MARCO TEÓRICO**

### **8.1 Marco conceptual**

#### **8.1.1 Propagación *in Vitro***

A diferencia de los métodos tradicionales para la propagación de orquídeas surge la propagación por medio de la técnica de cultivo de tejidos vegetales, específicamente la micro propagación que proporciona una serie de ventajas por medio de las cuales se puede obtener una propagación masiva de materiales, tal es el caso que ocupan las orquídeas que tienen un alto valor comercial para modificar los materiales con peligro de extinción. Por este método se obtienen grandes cantidades de plantas para comercialización como ornamento y para obtención de extractos de compuestos naturales (metabolitos secundarios) como es el caso de la vainilla. Es importante mencionar que se pueden propagar materiales desarrollando una multiplicación clonal o bien, sembrando semilla lo cual permite mantener la variabilidad genética de determinada especie (2).

A diferencia de la propagación sexual y/o natural, utilizando los métodos tradicionales se obtiene una germinación de las semilla de vainilla cercano al 5%, la propagación *in vitro* permite obtener la germinación de casi el 100% de las semillas. El método permite crecer materiales de semilla híbrida que posee alto valor comercial, propagar masivamente materiales que se encuentran en peligro de extinción, con lo que se obtiene plantas de menor costo ambiental y se evita la depredación del recurso nativo (2).

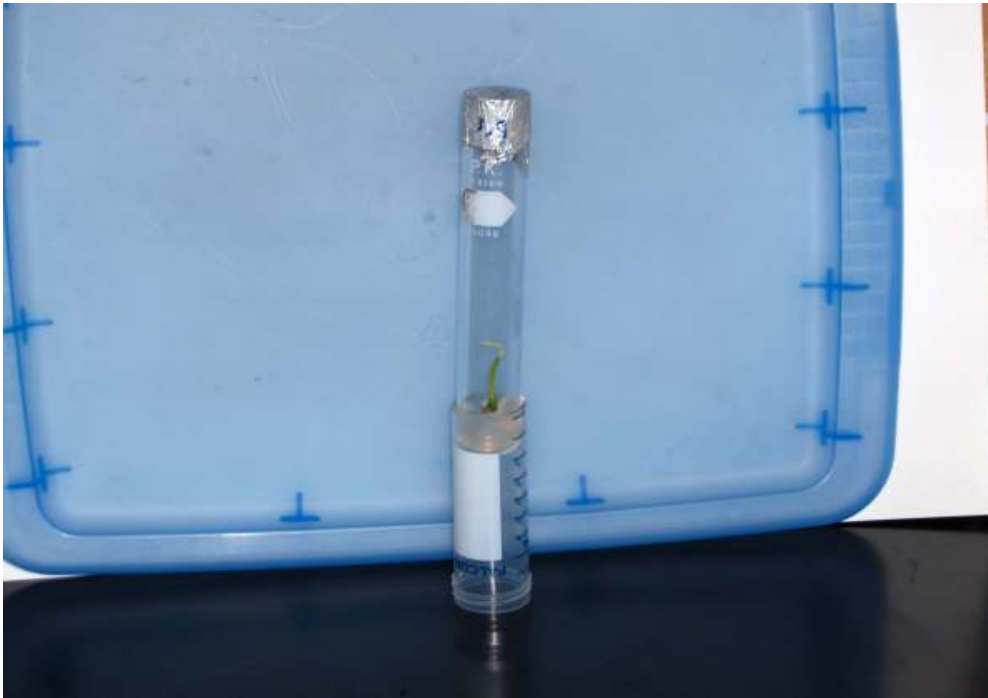


FIGURA 7. Semilla de *vainilla* germinada *in Vitro*.

### 8.1.2 Importancia del cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos combina las técnicas corrientes de fitomejoramiento con los nuevos métodos biotecnológicos y ofrece la oportunidad de reducir el tiempo para la producción de variedades mejoradas. En la mayoría de los cultivos de importancia económica se necesitan de 7 a 10 años, después del cruzamiento, para saber si se ha obtenido una variedad mejorada, mientras en cultivo de tejidos las mutaciones que parecen prometedoras pueden identificarse en un año o dos. Esto ofrece la ventaja de la reducción del tiempo y el volumen de siembra en campo comparada con los métodos convencionales (24).

La opinión de Hernández (32), es que el cultivo de tejidos no reemplaza completamente a los métodos convencionales, pues las grandes variaciones tienen lugar en el cruzamiento sexual, en tanto existe menos variación entre las células de una planta o variedad individual, no obstante es un buen método complementario en un programa de mejoramiento (14).

### **8.1.3 Ventajas del cultivo de tejidos *in vitro***

a. Ahorro y ganancia de espacio: en espacio reducido es posible mantener cantidades considerables de clones que servirán como semilla en el campo, por área disponible. Permite hacer uso del área vertical, acumulando varios niveles para el efecto.

b) Propagación acelerada: es posible teóricamente, obtener en un año de una sola planta, un millón de clones.

c) Disponibilidad inmediata y permanente del material: permite el acceso oportuno a la micro propagación en épocas en que las condiciones del campo no son las adecuadas.

d) Ausencia de infecciones y factores climáticos adversos debido a las condiciones asépticas en que se tienen los explantes ya que están libres de contaminantes, por lo que se cuenta con material que tiene la capacidad de someterse a las pruebas más rigurosas de cuarentena (31, 16).

### **8.1.4 Desventajas del cultivo de tejidos *in vitro***

a) Altos costos de mantenimiento e instalación de laboratorio.

b) Necesidad de tener mano de obra calificada.

c) Falta de presión de selección de los materiales con que se cuenta.

d) Pérdida de variabilidad que para algunas técnicas no es posible evitar (31).

El proceso a través del cual, se colocan en un medio de cultivo explantes de tejidos, órganos u otras estructuras de tejidos vegetales se define como micro propagación, haciéndolo asépticamente para lograr la propagación masiva de plantas bajo condiciones *in vitro*.

#### **8.1.5 Pasos que conlleva la micro propagación (Murashige, 1974)**

- a) Selección, desinfección y siembra del explánte en un medio de cultivo.
- b) Multiplicación de brotes.
- c) Trasplante a un medio de enraizamiento y finalmente transferencia al campo definitivo (25).

#### **8.1.6 Establecimiento de cultivo *in Vitro***

Para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro*, se siguen una serie de principios básicos: inicialmente es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar. El siguiente paso consistirá en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último, se debe proporcionar a las células, tejidos u órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas.

Los cultivos *in vitro* pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta. Sin embargo, la fuente inicial de material vegetal puede ser determinante para el éxito en el establecimiento de los mimos (16).



FIGURA 8. Corte longitudinal vaina de vainilla.

#### **8.1.7 Almacenamiento de germoplasma**

Los sistemas *in vitro* para el almacenamiento y preservación de germoplasma han recibido considerable atención en años recientes dando como resultado que las prácticas alternativas a medios convencionales de almacenamiento de material vegetativo son ahora posibles.

#### **8.1.8 Aspectos importantes de la conservación *in vitro***

##### **a. Regeneración**

La regeneración de las plantas enteras basada en los sistemas de cultivo de células es a menudo el paso que limita la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* a especies vegetales que no se pueden propagar mediante meristemos preformados. La regeneración reproducible de plantas enteras sigue siendo problemática.

#### b. Viabilidad

La evaluación de la viabilidad de los cultivos *in vitro* se debe realizar sistemáticamente. En condiciones de crecimiento lento, en que el período de transferencia se extiende durante meses o años, la frecuencia de evaluación de cultivos aumenta significativamente en comparación con la evaluación que se haría al material bajo otras condiciones.

#### c. Estabilidad genética

La estabilidad genética de los cultivos ha sido, durante mucho tiempo, un motivo de inquietud cuando se piensa aplicar las técnicas *in vitro* para la conservación del germoplasma. El material recuperado de la conservación *in vitro* debe representar genéticamente al material utilizado.

Los procesos de renovación de cultivos (sub cultivos) del material conservado bajo crecimiento lento, tienen la posibilidad de seleccionar los explantes mejores o más vigorosos por parte de la persona que realiza estos procesos.

### 8.1.9 Elementos importantes en la conservación *in vitro*

#### a. Limitación del crecimiento

El crecimiento rápido de los cultivos a tasas normales exige más mano de obra y aumenta la posibilidad de pérdidas debidas a accidentes o a contaminación microbiana durante la repetición continua de los sub cultivos; es necesario entonces reducir al mínimo la frecuencia de los sub cultivos, con lo que se logra, además minimizar la posibilidad de variación genética.

La tasa del crecimiento de los cultivos *in vitro* puede controlarse empleando principalmente los siguientes factores: temperatura, nutrimentos inorgánicos y orgánicos, reguladores del crecimiento y concentración osmótica del medio.

## **b. Temperatura**

La reducción de la temperatura ha sido el recurso más comúnmente utilizado para disminuir el crecimiento de los cultivos. La mayoría de los cultivos *in vitro* son mantenidos a temperaturas entre 20 y 30 grados centígrados; a temperaturas más bajas la tasa de crecimiento disminuye, pero esta reducción depende de las especies en cuestión.

## **c. Concentración de nutrimentos**

La relación entre la concentración de carbohidratos y los componentes nitrogenados del medio nutritivo puede tener efectos sobre las tasas de crecimiento y la morfogénesis en los cultivos *in vitro*. La sacarosa tiene, igualmente, un efecto en la viabilidad de los cultivos: concentraciones muy altas o muy bajas de ese azúcar resultan nocivas para la conservación de los tejidos *in vitro*.

## **d. Concentración de los reguladores del crecimiento**

Los niveles de citoquininas y de inhibidores de crecimiento, como el ácido abscísico, interaccionan con la concentración de sacarosa y con la temperatura de conservación y afectan así la viabilidad de los cultivos *in vitro*.

## **e. Concentración osmótica**

La limitación del crecimiento por causa de la concentración osmótica se debe, posiblemente, a la reducción de la absorción de agua y de nutrimentos del medio. Puesto que es altamente metabolizable, la sacarosa actúa osmóticamente en concentraciones altas. Otros agentes osmóticos difíciles de metabolizar, como el manitol y el sorbitol, son, posiblemente más efectivos que la sacarosa en la limitación del crecimiento de los cultivos, pero se debe tomar en cuenta que estas sustancias interaccionan con el contenido de sacarosa y con la temperatura de conservación (3).

#### f. Mantenimiento y almacenamiento a largo plazo

El material *in vitro* puede ser conservado en cultivo indefinidamente si se evita la contaminación y se transfiere a medios frescos cada cierto tiempo (60 días aproximadamente). Se puede mantener en reserva el material de sanidad comprobada para utilizarlo en el futuro. La tasa de crecimiento de las plantas depende de la temperatura de incubación, la composición de los medios y la variedad de la planta. De allí que se requieran, para un almacenamiento a largo plazo, modificaciones de los medios y de la temperatura de incubación (3).



FIGURA 9. Semilla de vainilla germinada lista para almacenar.



### **8.1.10 Explante**

El explante es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta.

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; la elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos han sido generalmente una fuente rica de explantes.

### **8.1.11 Propagación *in vitro* a partir de semilla**

Las orquídeas forman parte de las pocas plantas que se propagan por medio de cultivo de tejidos utilizando semilla (2).

En el año de 1922 desarrollando investigación en la Universidad de Cornell, Louis Knudson, logró demostrar que las semillas de las orquídeas pueden germinar *in vitro* si no está presente el hongo Micorriza para suplir las necesidades del embrión rudimentario. Esto lo logró incorporando al medio nutritivo artificial una fuente de carbono, en este caso se empleó sucrosa. Esta técnica actualmente se conoce como germinación asimbiótica y en la actualidad es la base para la propagación masiva de la industria de orquídeas a nivel mundial (2).

### **8.1.12 Métodos asépticos**

Las plantas normalmente se encuentran contaminadas por microorganismos, que no son patógenos bajo condiciones normales. Sin embargo cuando el tejido o el órgano es cultivado *in vitro*, el crecimiento de los microorganismos limita el desarrollo de las células y destruye tales cultivos, compitiendo con el explante por el medio de cultivo o modificando el mismo.

Para tener éxito en el establecimiento de cultivo de tejidos, así como para la posterior incubación de los mismos, es importante la estricta desinfección superficial de los explantes y esterilización de los medios de cultivo; trabajar en ambientes adecuados, así como la manipulación de los explantes observando las normas asépticas básicas.

Comúnmente se utilizan diversos productos químicos para la desinfección del material vegetal, o superficies donde se trabajarán cultivo de tejidos, pero deben usarse preferentemente aquellos productos que sean fácilmente removidos para no provocar daño a los tejidos vegetales. También es recomendable emplear dos diferentes desinfectantes.

Para la esterilización de los medios de cultivo y cristalería, se utiliza con mucha más frecuencia el calor. Se puede usar en forma de llama directa, de calor húmedo (vapor), o de calor seco (aire caliente). Cuando se utiliza el calor húmedo, puede ser en forma de vapor abierto o de vapor bajo presión.

La asociación de explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos, conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (hongos y bacterias), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Uno de los principales aspectos básicos que se debe tener en cuenta para el éxito es evitar contaminaciones con microorganismos, no solamente en el proceso de establecimiento de los cultivos sino también en los procesos de incubación y manipulación (3).

Para establecer cultivos asépticos es conveniente y/o necesario tomar en cuenta lo siguiente:

- Trabajar en ambientes adecuados.
- Esterilizar adecuadamente los medios de cultivo.
- Desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos.
- Realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia (3).

### **8.1.13 Componentes de los medios de cultivo**

#### **Sales inorgánicas**

##### **a. Macronutrientes**

Los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además de carbono, hidrógeno y oxígeno, los elementos más requeridos son principalmente N, P, K, Ca, Mg, y S.

El nitrógeno se adiciona en grandes cantidades y se encuentra presente en el medio en forma de nitrato iones de amonio, o la combinación de ambos iones. El sulfato de magnesio satisface tanto el requerimiento de magnesio como el de azufre. El fósforo puede adicionarse en cualquiera de las formas. El potasio se encuentra en grandes cantidades en la naturaleza, es un catión que se agrega en forma de KCl,  $\text{KNO}_3$ , ó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El calcio se adiciona con  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ó la forma anhidra de cualquier sal. El sodio es un catión que no es requerido por plantas superiores; sin embargo, puede ser un elemento esencial para cultivos de halófitas, o plantas C4. El cloro está presente en la forma de KCl ó  $\text{CaCl}_2$  (15).

##### **b. Micronutrientes**

Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son: Fe, Mn, Zn, B, Cu, Co, y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos.

El hierro es requerido para la formación de precursores de la clorofila. El manganeso es necesario para el mantenimiento de la ultra estructura y el proceso fotosintético (la actividad del fotosistema II es proporcional al contenido de manganeso). El cobre y en zinc son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos. El molibdeno y el hierro forman parte de las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa. El cobalto es el metal componente de la vitamina B12. El boro es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática, está involucrado en la síntesis de bases de nitrógenos, en particular uracilo.

Varios micronutrientes están relacionados con la actividad de los reguladores de crecimiento. Ejemplos: Zn-auxinas (Zn está relacionado con la síntesis de triptófano, precursor del AIA). Deficiencia de boro reprime la síntesis de citoquininas, pero aumentan los niveles de auxinas.

Agentes quelatos: son compuestos cuyas moléculas son capaces de detener un ión de un metal con varias uniones químicas, formando un anillo complejo (quelato), ejemplo: AEDT (ácido etilendinitrotetracético). Bajas concentraciones de AEDT estimulan el crecimiento, haciendo que el hierro esté disponible en bajas cantidades (15).

## **Vitaminas**

Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio algunas de ellas, hasta cuando los cultivos crezcan o se hayan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico, se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria. Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades (15).

Las vitaminas más empleadas son: tiamina (vitamina B1), se añade como tiamina HCl, en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/L. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales. Ácido Nicotínico (Niacina). Piridoxina (Vitamina B6), se añade como piridoxina-HCl. Mio-inositol, no es propiamente una vitamina, sino un azúcar –alcohol, tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, partiendo probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico. El ácido pantoténico ayuda al crecimiento de ciertos tejidos. El ácido fólico disminuye la proliferación de tejido en la oscuridad, mientras que en la luz la aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido Paminobenzóico. Riboflavina es inhibidor del crecimiento de raíces. La vitamina E ayuda a la formación de callos que provienen de embriones y en cultivos en suspensión ayuda a la viabilidad de células (15).

#### 8.1.14 Reguladores del crecimiento

Son compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades y por la naturaleza o el arreglo de su molécula fomentan, inhiben o modifican el desarrollo de las plantas (9). Adicionalmente a los nutrientes es necesario agregar una o más sustancias reguladoras frecuentemente auxinas y/o citoquininas pero a veces también giberelinas o ácido abscísico para así mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos (14). En micropropagación principalmente se utilizan citoquininas y auxinas como reguladores de crecimiento (28).

#### Auxinas

El nombre auxina significa en griego "crecer" (14) y es el término genérico que se aplica al grupo de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la extensión de las células (9). El ácido indolacético (AIA) es la más predominante sin embargo evidencias recientes sugieren que existen otras auxinas indólicas naturales en las plantas (4). Aunque la auxina se encuentra en toda la planta, las más altas concentraciones se localizan en las regiones meristemáticas en crecimiento activo y se le encuentra tanto como molécula libre o en formas conjugadas inactivas (5). La auxina ha sido implicada en la regulación de un número de procesos fisiológicos. (5, 21).

- *In vitro* se utilizan para promover la división celular y la diferenciación de raíces.
- Estimula el crecimiento y maduración de frutos.
- Floración.
- Senectud.
- Geotropismo. La auxina se dirige a la zona oscura de la planta produciendo células que se encuentran en la zona clara de la misma. Esto produce una curvatura en ella que va hacia la luz, movimiento que se conoce como fototropismo.

- La caída de hojas, flores y frutos jóvenes.
- Dominancia apical. El efecto inicial preciso de la hormona que subsecuentemente regula este arreglo diverso de eventos fisiológicos no es aún conocido. Durante la elongación celular inducida por la auxina se piensa que actúa por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones en la membrana plasmática y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas.

Normalmente se usan los componentes siguientes como fuente de auxina (26).

De origen natural:

- Ácido indolacético (AIA)
- Ácido fenilacético

De origen sintético:

- Ácido naftalenacético (ANA)
- Ácido indol 3-butírico (IBA, por sus siglas en Inglés)
- Naftalenacético (2,4 D) (14,26).

#### **A. Ruta de biosíntesis**

El precursor primario en la planta es el triptófano y la biosíntesis se realiza en ápices en crecimiento, hojas en desarrollo (hojas pequeñas en crecimiento), semillas, frutos. Y donde se sintetiza existe más cantidad (10), para ello existen 3 rutas de síntesis:

- Vía del ácido indol-pirúvico, es la vía primaria de la síntesis
- Vía del triptomina
  - Vía del indol-acetaldoxina, presente sobre todo en el género *Brassica* (Coles) (5).

## **B. Modo de acción**

A nivel celular la estimulación del crecimiento exige necesariamente en las células vegetales un aumento de la plasticidad de la pared celular, la cual es consecuencia de la ruptura de enlaces de las moléculas que configuran esta pared. La auxina induce el aumento de la plasticidad parietal, y la extensión de los protones H del citoplasma hacia el espacio parietal. El aumento de acidez provoca la distensión de las paredes y la activación de ciertas enzimas. Esta acción conlleva dos fases, una acción rápida y una acción lenta (5).

- Activa la bomba de protones
- Coenzima (H-receptor): Activa una serie de enzimas al unirse al receptor
- Aumenta la síntesis de ADN
- Síntesis de nuevo de ADNm (5)

## **Citoquininas**

Las citoquininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente fueron llamadas quininas; sin embargo, debido al uso anterior del nombre para un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adopta el término citoquinina (citocinesis o división celular). Son producidas en las zonas de crecimiento como los meristemos en la punta de las raíces. Las mayores concentraciones de citoquininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo ambos sufriendo una rápida división celular. Las citoquininas también se forman en las raíces y son translocadas a través del xilema hasta el brote. Sin embargo, cuando los compuestos se encuentran en las hojas son relativamente inmóviles. Entre los efectos generales de las citoquininas en los procesos fisiológicos de las plantas se encuentran:

- Estimulación de la germinación de las semillas
- Estimulación de la formación de frutas sin semillas
- Ruptura de letargo de la semilla
- Inducción de la formación de brotes
- Mejora de la floración
- Alteración en el crecimiento de frutos
- Ruptura de la dominancia apical
- Mantiene la síntesis de proteínas (5)
- Acción de la organogénesis (10)
  - Suprime el efecto inhibitorio de la auxina sobre las yemas específicas para el desencadenamiento de la mitosis.
  - Retarda la senescencia de los tejidos (10)
- Aumenta la división y diferenciación celular. Su acción ocurre en dos etapas
  - Durante la mitosis aumenta la cantidad de ADN
  - En la citocinesis estimulan la síntesis de proteínas específicas de la división celular (10)

Se adicionan al medio de cultivo para promover la división celular y la diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos y órganos. Se usan los compuestos siguientes como fuente de citoquinina (28).

BA (6-Benciladenina).

BAP (6-Bencilaminopurina) estimula la proliferación de yemas axilares

2ip (N-Isopentamilaminopurina).

Zeatina, promueve el crecimiento del tallo principal (28).



### **A. Ruta de biosíntesis**

Las citoquininas están presentes en todos los tejidos y su metabolismo es complicado, estas sustancias están presentes en el tejido bajo varias formas.

- a. Bases libres
- b. Ribonucleosis
- c. Ribonucleótidos

Como constituyente de ciertos (ADNt) existen dos mecanismos de biosíntesis:

- a. Isopentenilación de la adenina monofosfato (AMP por sus siglas en Inglés)



Las tres primeras formas se originan por esta vía.

- b. Por degradación de moléculas de ADN, por esta vía se produce muy poca citoquinina (9).

### **B. Modo de acción**

Se considera que actúan a través del control de la síntesis de proteínas específicas para el desencadenamiento de la mitosis (10).

### **Giberelinas**

Hormona del crecimiento, son diterpenoides tetracíclicos ácidos derivados del ent – kaureno (14). Todas tienen la misma estructura química, las diferentes giberelinas difieren por las características de los grupos laterales (-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, CHO, etc.) (12), existen dos tipos:

- de 20 carbonos
- de 19 carbonos (+ activos) (10)

Entre los efectos fisiológicos en las plantas se encuentran los siguientes:

- Producen el alargamiento de entrenudos en plantas enteras (su déficit produce plantas enanas)
- Estimulan la floración sobre todo en plantas de roseta al favorecer la elongación de los entrenudos
- Estimulan el crecimiento de hojas y de frutos (partenocarpia)
- Estimulan la germinación y la brotación de yemas al suprimir la inhibición causada por procesos de dormancia (9)
- Revierte la planta adulta en juvenil (10)
- Baja el desarrollo de fruto y la maduración (10)
- Vernalización (10)

#### **A. Ruta de biosíntesis**

- Precursor primario. El ácido mevalónico (AMV) a partir de él se generan una serie de compuestos intermediarios hasta llegar al Kaureno y luego al aldehído del AG12. De este se derivan las múltiples giberelinas que se conocen. Pero antes de llegar al Kaureno existe un paso intermedio que forma el Farnesil – Pirofosfato (FPP). Es un paso clave ya que a partir de él podemos orientar la síntesis hacia el ácido giberélico o desviarla hacia el ácido abscísico (ABA por sus siglas en inglés). Esto dependerá de la situación fisiológica de la planta (9).
- Sitios de síntesis. Las síntesis ocurren en aquellas regiones que presentan división celular activa, ápices de tallo y raíces, en las hojas, en el embrión (12). También se presenta en órganos productores (flores, semillas inmaduras, embriones germinados) (10).

#### **B. Mecanismos de acción**

- Estimula la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa, enzima encargada de hidrolizar el almidón para formar compuestos energéticos necesarios al crecimiento del embrión.

- Efecto sobre la organización de la membrana, participan en la síntesis activa de enzimas implicadas en la formación de los lípidos que conforman la membrana celular (9).

#### **8.1.15 Aplicación de los reguladores del crecimiento al cultivo *in vitro***

Adicionalmente a los nutrientes generalmente es necesario agregar una o más sustancias reguladoras frecuentemente auxinas y/o citoquininas, pero a veces también giberelinas o ácido abscísico para mejorar el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos. Por otro lado los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como la finalidad del cultivo *in vitro* (21).

##### **A. Auxinas**

Se relaciona con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción del callo. El IBA y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento, el 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio 1N (22).

##### **a. Efectos en los tejidos *in vitro***

- Promueve el crecimiento del callo, de las suspensiones celulares, de órganos (meristemas y ápices)
- Regula la morfogénesis, especialmente en asociación con las citoquininas (9)
- Inducción de raíces (7)

## **B. Citoquininas**

En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 1N (21). En cultivos *in vitro* inhibe las auxinas-oxidadas (mediante el nivel de auxina en los tejidos). Está también implicado en el metabolismo de los carbohidratos, en la actividad enzimática de las vías glucolítica y oxidativa de las pentosas fosfato (9).

### **a. Efectos en los tejidos *in vitro***

- Estimulación de la división celular. En su ausencia la metafase de la mitosis es considerablemente afectada.
- Involucradas en la síntesis de proteína.
- La proliferación de callo proveniente de tejidos de dicotiledóneas requiere la presencia tanto de auxina como de citoquinina, pero la aplicación en forma secuencial es más provechosa (9).
- Modificación de la dominancia apical (21).

## **C. Giberelinas**

Existen multitud de giberelinas conocidas, la de mayor uso es el AG3 pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor ya que se pierde el 90% de su actividad después del autoclaveado. Comparado con las auxinas y citoquininas las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo su función principal es el alargamiento de las regiones subapicales. El AG3 (Ácido giberélico) es soluble en agua fría hasta 1000 mg l<sup>-1</sup> (19), sus efectos son debidos a la estimulación de enzimas específicas o a cambios en la disponibilidad endógena de auxina (9).

#### **a. Efectos de las giberelinas (AG3) en los tejidos *in vitro***

En general el crecimiento y la diferenciación ocurren sin giberelinas, en el caso de cultivos de células en bajas densidades son sin embargo esenciales.

- Efecto sobre la morfogénesis.
- Inhibe la formación de embriones somáticos.
- Tiene poco o ningún efecto en la diferenciación de células.
- Estimula el crecimiento y el desarrollo en órganos preformados (meristemo) generalmente impide la formación de raíces, en el cultivo de ápices estimula el crecimiento y su presencia es generalmente crítica para permitir la elongación de los tallos formados (9).

#### **Aminoácidos**

Ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *in vitro*; sin embargo existen varios que se han utilizado experimentalmente. Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio.

Los aminoácidos también pueden actuar como agentes quelantes. A continuación se indican las funciones principales de los aminoácidos en sistemas *in vitro*. La glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno.

L – arginina estimula raíces, L-serina es empleada en cultivo de microsporas y L-cisteína es un agente reductor (10).

#### **Carbohidratos**

Son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar empleado universalmente. Le siguen en importancia glucosa, maltosa, rafinosa, fructuosa, galactosa, manosa y lactosa (15).

#### **Agua**

El agua utilizada para la preparación de soluciones debe ser destilada o desmineralizada (15).

## **Agentes solidificantes**

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa el agar son:

- Con agua el agar forma geles que se derriten a 100 grados centígrados y se solidifican a 45 grados centígrados. Esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación
- El agar no es alterado por las enzimas vegetales
- El agar no reacciona con los constituyentes del medio
- No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio

Otros compuestos se han empleado para sustituir el agar; sin embargo, pocos han tenido éxito. Posiblemente el que más popularidad ha alcanzado es Gelrite. Debido a que el agar es costoso, es importante tomar en cuenta otros compuestos que nos permitan sustituir este soporte (15)

### **8.1.16 Elaboración del medio de cultivo**

Se preparan las soluciones madre evitando que estas se precipiten y luego se mezclan en un recipiente conteniendo agua destilada estéril o bien agua desmineralizada. En el caso del azúcar u otros compuestos que se adicionan en cantidades grandes al medio de cultivo, no deben prepararse soluciones madre, sino que en el momento de la preparación del medio se pesan y aplican. Luego de esto se afora al volumen de medio que se desea preparar y se ajusta al pH y por último se mezcla el agente gelificante que puede ser agar, Phytigel, Gelrite o Gelcarin. Se procede a calentar el medio para lograr disolver el agente gelificante, luego de esto se procede a verter el medio en los recipientes del cultivo, se tapan para proceder a esterilizar el medio con la ayuda de una autoclave de 15 a 20 minutos a 121 grados centígrados y 1.1 kg/cm<sup>2</sup> de presión. El tiempo de esterilización dependerá del recipiente en el cual se vertió y del volumen del medio en dicho recipiente.

### **8.1.17 Desinfección de semillas de orquídeas**

Debido a que la semilla se encuentra descubierta se puede tomar una muestra y observarla al estereoscopio; si el embrión presenta forma redonda y coloración verde es indicativo del grado de madurez y viabilidad ideal para su siembra. Las semillas se colocan en un recipiente al cual se le agrega la solución de cloro comercial entre el 2 y el 10% v/v por un período de tiempo que puede ser de 3 a 15 minutos; a esta solución se le debe de aplicar el surfactante tween 20 a razón de 2 a 3 gotas por litro de solución. El porcentaje de cloro y el tiempo de inmersión son variables ya que se debe tomar en cuenta el tamaño y considerar el tiempo que tiene la cápsula de haber abierto para inferir sobre el estado de contaminación que esta puede presentar.

Las semillas en la solución deben ser agitadas para que la desinfección sea más efectiva, luego de transcurrido el tiempo se debe decantar la solución con todo y semillas en un embudo al cual previamente se le ha colocado papel filtro, este proceso se realiza en la campana de flujo laminar. Luego se agrega agua destilada estéril casi al nivel de la parte alta del embudo con lo que se inicia la limpieza de las semillas de los residuos del desinfectante. Este procedimiento debe de repetirse por tres veces consecutivas, cada vez que el agua aplicada termine de pasar a través del papel filtro colocado en el embudo, para garantizar que las semillas desinfectadas estén libres de residuos de cloro (17).

### **8.1.18 Siembra de semillas de orquídeas**

A continuación (Fig. 10), se muestra la técnica de la siembra de la semilla de orquídea (vainilla), se coloca la vaina sobre una caja de petri, vidrio o papel debidamente esterilizado, y con la ayuda de pinza y bisturí, se realiza un corte longitudinal de la misma, el cual permite que toda la semilla quede expuesta y entonces con la ayuda de una espátula o bien con un bisturí se procede a tomar la semilla, la cual se distribuirá al golpear el instrumento en la boca del frasco que contiene el medio de cultivo.

Es importante que el frasco empleado sea flameado junto con su respectiva tapa, antes y después de la siembra de la semilla. Se procede a la identificación de los recipientes de cultivo en donde se incluye un número correlativo, la fecha de siembra, un código o el nombre de la especie, etc. (15).



**FIGURA10. Siembra de semillas de vainilla para la germinación *in vitro*.**

#### **8.1.19 Condiciones de incubación**

Los recipientes son transferidos al área de incubación en donde se colocarán en las estanterías bajo condiciones controladas. La temperatura del cuarto debe ser de 22 grados centígrados aproximadamente con un fotoperíodo de 16 horas. Luego de transcurridos 2 ó 3 meses de la siembra, comenzarán a germinar las semillas y un mes después comenzarán a formarse los protocormos que finalmente darán origen a una nueva planta (15).



#### **8.1.20 Influencia del nitrato de plata en la multiplicación *in vitro* y formación de raíces en *Vanilla planifolia***

La vainilla generalmente es propagada por órganos vegetativos; sin embargo, estos métodos proporcionan bajas cantidades de material vegetal en detrimento de los mismos en las plantas madres dado que se les ocasiona heridas las cuales pueden ser entrada de microorganismos.

La técnica de cultivo *in vitro* sirve para propagar la vainilla partiendo de yemas, semillas, callos y raíces, la utilización del nitrato de plata se favorece la formación de raíces, y brotes. Se han utilizado con éxito yemas nodales las cuales se cultivaron en el medio Murashige and Skoog suplementada con 2 mg/L de benzilaminopurina y 1 mg/L de ácido naftalanacético, 0.6 % de sucrosa, después de 60 días de incubación, los brotes fueron separados y subcultivados en un medio conteniendo 0.01 mg 1- 1 de ácido indol butírico (13).

## 8.2 Marco referencial

**Cuadro 3. Clasificación taxonómica de la vainilla**

REINO:	Plantae
SUB REINO:	Trachechionta
DIVISION:	Magnoliophyta
CLASE:	Liliopsida
SUB CLASE:	Liliidae
ORDEN:	Orchidales
FAMILIA:	Orchidaceae
GENERO:	<i>Vanilla</i>
ESPECIE:	<i>Vanilla planifolia</i> Andrews
<b>Fuente (1)</b>	

Como se indicó en la clasificación taxonómica (cuadro 3), la vainilla pertenece a la familia Orquideaceae y al género *Vanilla*. De este se conocen unas 100 especies, aunque las más utilizadas comercialmente son: *V. planifolia*, *V. pompona* y *V. tahitensis*.

Las plantas de este género se reconocen fácilmente por su hábito trepador, monopodial, con tallos que pueden alcanzar muchos metros de longitud, abrazados a los árboles. La especie típica del género es *Vanilla planifolia*. El género *Vanilla* está distribuido en todas las zonas tropicales de la tierra, pero solo unas pocas especies tienen valor económico por ser fuente productiva del extracto vainilla (4). Es una planta sarmentosa de tallo simple y ramificado, cilíndrico, grande, flexible, sustancioso, verde y carnoso. Con entrenudos dispuestos en zigzag (8). Las hojas son de un verde brillante, grandes, suculentas, elípticas, estrechamente lanceoladas. Con nervaduras paralelas y oscuras que se vuelven prominentes cuando la hoja se seca, están opuestas a las raíces adventicias. El sistema radical es denso y corto. Las raíces subterráneas son llamadas trazadoras y se extienden en un radio de 80 cm. También tiene raíces adventicias o crampones, las cuales son carnosas y largas, que la planta utiliza para adherirse al tutor y nutrirse a través de una estructura exterior llamada velamen.

Las flores están dispuestas en racimos axilares, cortos, fuertes, con 20 o más flores amarillo verdosas y poco visibles. Salen de las axilas de las hojas. Con eje corto y succulento, son de poca duración (1 – 2 días como máximo), la inflorescencia es sucesiva. El fruto es una vaina casi cilíndrica. El conjunto de vainas sobre una misma inflorescencia se llama pezón. Las semillas son diminutas, carecen de endospermo. Son fértiles solo si son producto de polinización natural (1).

#### **8.2.1 Características botánicas de *Vanilla planifolia* Andrews**

El tallo es de un grosor mediano, las hojas son ovaladas y elípticas, de tamaño intermedio de 5 a 15 cm. de largo 2-10 de ancho de un color verde pálido, labelo con glóbulo terminal, truncado vainas aromáticas, casi cilíndricas, de 15 a 25 cms de largo y 8 a 14 milímetros de diámetro. Rara vez dehiscentes, tarda de 3 a 10 meses en madurar. El origen es de la zona tropical de América Central e India Occidental (25).

#### **8.2.2 Ubicación del experimento**

La investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales ubicado en el edificio T - 8, en el 3er. nivel salón C-16, de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC).

## 9. OBJETIVOS

### 9.1 Objetivo general

1. Evaluar la germinación de semillas de *Vanilla planifolia* Andrews *in vitro*, en medios de cultivo MS (Murashige Skoog 1,962) y la combinación de dos reguladores de crecimiento, Bencíl Amino Purina (BAP), y Acido Naftalanacético (ANA).

### 9.2 Objetivo específico

1. Determinar el porcentaje de germinación a nivel *in vitro* de la semilla de *Vanilla planifolia* Andrews.
2. Determinar el tiempo en que germinan las semillas de *Vanilla planifolia* Andrews en el medio MS (Murashige Skoog 1,962).
3. Determinar la mejor dosis de BAP.
4. Determinar la mejor dosis de ANA.
5. Determinar el porcentaje de Oxidación de semillas de *Vanilla planifolia* Andrews en el medio MS (Murashige Skoog 1,962).
6. Determinar el porcentaje de contaminación de las semillas de *Vanilla planifolia* en el medio MS (Murashige Skoog 1,962).

## 10. HIPÓTESIS

El medio MS (Murashige Skoog 1,962) y las combinaciones de dos reguladores de crecimiento auxinas-citocininas permitirán incrementar significativamente la germinación de semilla de *Vanilla planifolia* Andrews.

## **11. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **11.1 Reactivos y materiales**

Sales minerales, constituyentes de los medios de cultivo, agua destilada, agua desmineralizada, hipoclorito de sodio, alcohol al 70 y 90%, sacarosa, ácido naftalanacético, bencíl amino purina, agar, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio 1 N, papel aluminio, papel toalla, maskin tape, marcadores, mesas, frascos de 100 ml de capacidad.

### **11.2 Cristalería y equipo**

Balanza analítica, potenciómetro, horno microondas, autoclave, campana de flujo laminar, refrigerador, agitador magnético, pipetas de 1, 5, 10 y 25 mililitros, micro pipetas de 100 y 1000 mililitros, probetas de 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 mililitros, erlenmeyer de 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mililitros, frascos, mecheros, papel parafilm, agujas de disección, micro espátulas, tijeras, bisturí, pinzas, pizetas, cajas petri, frascos de 100 mililitros, incubadora.

### **11.3 Medios de cultivo**

#### **11.3.1 Preparación de las soluciones madres**

Las soluciones madres se hicieron en función del componente para el medio basal Murashige y Skoog (MS) (21). Esto con el fin de ahorrar pasos en la elaboración de los medios de cultivo. A continuación se describen los pasos empleados en la elaboración de las soluciones madres.

#### **A. Solución madre de macronutrientes del medio nutritivo MS (Murashige y Skoog)**

Se preparó 1000 ml de esta solución, para lo cual se empleó un beacker de 1 litro, en el cuadro 4 se describen los componentes.

**Cuadro 4. Componentes de macro nutrientes  
Murashige y Skoog a concentración 20 X en un volumen  
de 1000 ml.**

Sustancia	Peso (grs.)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	23.1
$\text{KNO}_3$	26.6
$\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$	5.18
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.38

Pesados los componentes se agregaron al beacker conteniendo 250 ml de agua desmineralizada estéril, este se mantuvo en constante agitación con el agitador magnético hasta observar que todas las sustancias estuvieran disueltas, el contenido se traslado a una probeta de 1000 ml, luego se aforó con agua desmineralizada estéril hasta llegar a completar el volumen deseado siendo este 1000 ml, seguidamente se volvió a agitar la solución y se guardó en frascos esterilizados identificados y tapados adecuadamente, estos se almacenaron hasta su uso en refrigeración a una temperatura de 4 °C. De igual forma se preparó una solución patrón a 30X de macronutrientes consistentes en  $\text{CaCl}_2 (2\text{H}_2\text{O})$  para lo cual se prepararon 500 ml, luego se aforo hasta 1000 ml siendo este el volumen deseado.

#### **B. Solución madre de micronutrientes**

Se prepararon dos soluciones por aparte de 100 ml cada una, a las que se les nombró micro A y micro B, para ello se agregaron 50 ml de agua desmineralizada estéril en un beacker de 250 ml luego de pesados se agregaron los componentes que se describen a continuación en los cuadros 5 y 6 .

**Cuadro 5. Componentes micronutrientes A del medio nutritivo Murashige y Skoog en un volumen de 1000 ml.**

Sustancia	Peso (grs.)
	MICRO A a 1000X
MnSO <sub>4</sub> . (4H <sub>2</sub> O)	2.23
ZnSO <sub>4</sub> . (7H <sub>2</sub> O)	0.86
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.025

**Cuadro 6. Componentes de micronutrientes B en un volumen de 1000 ml.**

MICRO B a 5000X	
CoCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.0125
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O)	0.0125

Pesados los componentes se agregaron al beacker conteniendo 50 ml de agua desmineralizada estéril, esta se mantuvo en constante agitación en el agitador magnético hasta observar que todas las sustancias estuvieran disueltas; el contenido se trasladó a una probeta de 500 ml, luego se aforó con agua desmineralizada estéril hasta llegar al volumen deseado siendo este 1000 ml, seguidamente se volvió a agitar la solución y se guardó en frascos esterilizados, identificados y tapados adecuadamente, además de colocarles forro de papel aluminio, estos se almacenaron hasta su uso en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

Por aparte se preparó otra solución de micro nutriente de KI la cual estuvo a 1000X, para ello se preparó 50 ml en la que se agregó 0.0415 gramos del compuesto mencionado, se aforó a 1000 ml siendo este el volumen deseado, se guardó en frascos esterilizados, identificados y tapados adecuadamente, además de colocarles forro de papel aluminio, estos se almacenaron hasta su uso en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

### **C. Solución madre de hierro a 200X**

Se preparó una solución de 250 ml de la siguiente forma:

- a. En un beacker se colocó 100 ml de agua desmineralizada estéril
- b. Seguidamente el beacker se colocó en la estufa
- c. Se agregó al agua caliente 1.865 gr de  $\text{Na}_2\text{AEDT}(\text{H}_2\text{O})$
- d. Disuelto lo anterior se agregó 1.3925 gr de  $\text{FeSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$

Disueltos los elementos, la solución se aforó en una probeta al volumen deseado siendo este 250 ml, se volvió a agitar y luego se traslado la solución a su envase colocándole su respectiva etiqueta, además de colocarle forro de papel aluminio, se tapo debidamente y se guardo en refrigeradora a 4°C

### **D. Solución madre de vitaminas a 1000X**

Se preparó una solución de 50 ml para lo cual en un beacker de 100 ml se colocó 25 ml de agua desmineralizada estéril en constante agitación, se pesó 0.02 gr de tiamina y se agregó al beacker, después de disuelto el compuesto se aforó en una probeta de 50 ml según el volumen deseado, la solución se trasladó a un envase de vidrio y se almacenó en refrigeración a 4°C.



## **F. Reguladores de crecimiento**

Los reguladores utilizados fueron, BAP (bencil-amino purina), ANA (ácido naftalanacético), GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), IBA (ácido indol butírico, por sus siglas en inglés), las cantidades de estos dos últimos se describen en la preparación de los medios de cultivo a continuación, previo a su utilización el BAP y el IBA se disolvieron en hidróxido de sodio 1 N, para el GA<sub>3</sub> se disolvió en alcohol al 95%.

Se realizaron soluciones madres para cada regulador en las siguientes concentraciones: ANA 2000 mg/L, BAP 2000 mg/L, IBA a 800 mg/L, GA<sub>3</sub> 2000 mg/L.

### **11.3.2 Preparación de los medios de cultivo**

Se preparó la cantidad de medio basal según conveniencia para lo cual se siguió la siguiente metodología: en un beacker se agregó agua desmineralizada estéril, se agregó al recipiente una barra magnética y se colocó sobre el agitador magnético el cual estuvo en constante agitación, se agregaron los componentes de cada medio basal (cuadro No. 7) según cantidad deseada, para el caso del medio nutritivo Murashige y Skoog, el orden fue el siguiente:

- a) Macro nutrientes; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub> MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O)
- b) Micronutrientes A; MnO<sub>4</sub> (4H<sub>2</sub>O), ZnSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NaMoO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O), KI
- c) Micronutrientes B; CoCl<sub>2</sub> (6H<sub>2</sub>O), CuSO<sub>4</sub> (5H<sub>2</sub>O)
- d) Hierros, Na<sub>2</sub>AEDT, FeSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O)
- e) Vitaminas; tiamina
- f) Reguladores de crecimiento según las dosis a evaluar, para la fase de inducción de brotes; 0.01 mg/L; 0.05 mg/L y 0.1 mg/L de ácido naftalanacético (ANA), 0.05 mg/L, 0.1 mg/L y 0.5 mg/L de bencil amino purina (BAP), a excepción de los tratamientos testigos que tuvieron cero dosis de reguladores evaluados. Todas las unidades experimentales fueron suplementados con 1 mg/L de GA<sub>3</sub> y para la fase de inducción de raíces en los brotes

g) solo se utilizó el ácido indol butírico (IBA) y la concentración fue de 0.5 mg/L, tanto el GA3 y el IBA fueron constantes para todos los tratamientos

h) Sucrosa

i) Se agregó antioxidante establecido en la fase de sobrevivencia de explantes a la oxidación por fenoles y a la contaminación por microorganismos, a todas las unidades experimentales de las fases de inducción de brotes e inducción de raíces en los brotes, incluyendo los testigos

j) Se aforó la solución

k) Se midió el pH el cual estuvo a 5.7, para ello se utilizó, según fue necesario; una solución de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N

l) Se agregó agar (8.0 gr/L)

m) Se calentó en horno microondas hasta disolver el agar.

n) La solución se distribuyó en las unidades experimentales consistiendo en frascos de 100 ml de capacidad (25 ml de medio por frasco)

ñ) Cada frasco se rotuló según tratamiento

o) Todas las unidades experimentales se esterilizaron en autoclave durante 25 minutos a una presión de  $1.05 \text{ kg/cm}^2$  a una temperatura de  $120^\circ\text{C}$

p) Las unidades experimentales se colocaron en el cuarto de incubación hasta su utilización

#### 11.4 Material vegetal

El material vegetal se colectó en los meses de junio y julio del año 2007, se colectaron vainas de la especie *Vanilla planifolia* según descripción de Ames y Correl (1), las cuales son producto de inflorescencias cortas en racimos o espigas laterales, cápsulas largas y carnosas.

La zona de donde proviene la vaina de Vanilla corresponde al bosque muy húmedo subtropical cálido, según la clasificación de Holdridge (20). La cual se ubica entre las comunidades Santo Tomás, San José la Veinte, Santa María Tzejá y Santa María Dolores del municipio de Ixcán, Quiché. Abarcando aproximadamente 169 Km<sup>2</sup>.

La vainilla se recolectó en las condiciones naturales anteriormente descritas, se hizo el corte de la vaina con unas tijeras de jardinería nuevas y estériles, se utilizaron guantes de hule para la manipulación de la misma, se le roció una solución de alcohol al 70%, se envolvió en una bolsa de papel nueva y se introdujo a una pequeña hielera con hielo seco para su traslado a el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de San Carlos de Guatemala.



FIGURA 11. Muestras vegetales de *Vanilla planifolia*.

### 11.5 Propagación *in vitro*

#### a. Selección de la vaina

Se seleccionó la vaina de acuerdo a características deseables como la madurez la cual fue aproximadamente del 60 %, esta no presentaba dehiscencia, daños por insectos, mecánicos, o enfermedades.



FIGURA 12. Selección de la vaina de *Vanilla planifolia*.

b. Desinfección de la vaina

Se cortaron los extremos de la vaina, luego se procedió a lavarla con agua estéril y jabón antibacterial para eliminar impurezas. Dentro de la campana de flujo laminar, se transfirió a alcohol etílico al 70 % por 30 segundos, luego se trasvasó a agua desmineralizada estéril para efectuar lavados y quitar exceso de alcohol, luego se transfirió a una solución de hipoclorito de cloro al 3 % por 60 segundos, después se lavó por tres veces con agua estéril desmineralizada, realizando un corte longitudinal dejando expuestas las semillas de vainilla.

### c. Siembra de semillas

La vaina con la semilla expuesta se colocó sobre una caja de petri, con la ayuda de una pinza y una micro espátula se procedió a separar las semillas y colocarlas sobre el medio de cultivo, luego se procedió a cerrar el tubo de ensayo (figura 13).



FIGURA 13. Siembra de semillas de *Vanilla planifolia in vitro*.

### 11.6 Incubación de la semilla

Después de haber hecho la inoculación de todas las semillas en sus respectivas unidades experimentales, estas se trasladaron al cuarto de incubación las cuales estuvieron en condiciones propicias para el desarrollo de las mismas. El cuarto de incubación estuvo equipado con una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1000 a 3000 lux de intensidad, la temperatura media del cuarto fue de 25 grados centígrados con un foto período programado de 16 horas luz.

### 11.7 Descripción de los tratamientos

A continuación en el cuadro 7 se describen las concentraciones de bencíl amino purina (BAP) y de ácido naftalanacético (ANA) que se evaluaron, a excepción de el testigo absoluto al cual no se le agregó ninguna dosis de BAP ni de ANA, todas las unidades experimentales fueron suplementadas con 30 gr/L de sacarosa, 6 gr/L de agar, utilizando un pH de 5.7; en el cuadro 7 se detallan las combinaciones hormonales utilizadas, siendo un total de diez tratamientos con cien repeticiones cada tratamiento lo que hace un total de 1000 unidades experimentales.

**Cuadro 7. Descripción de los tratamientos utilizados en la germinación de brotación en cada medio de cultivo**

MEDIO NUTRITIVO	COMBINACIÓN HORMONAL		Tratamientos
	BAP mg/L	ANA mg/L	
	0	0	T1
	0.05	0.01	T2
	0.05	0.05	T3
	0.05	0.1	T4
Murashige and Skoog, 1,962	0.1	0.01	T5
	0.1	0.05	T6
	0.1	0.1	T7
	0.5	0.01	T8
	0.5	0.05	T9
	0.5	0.1	T10

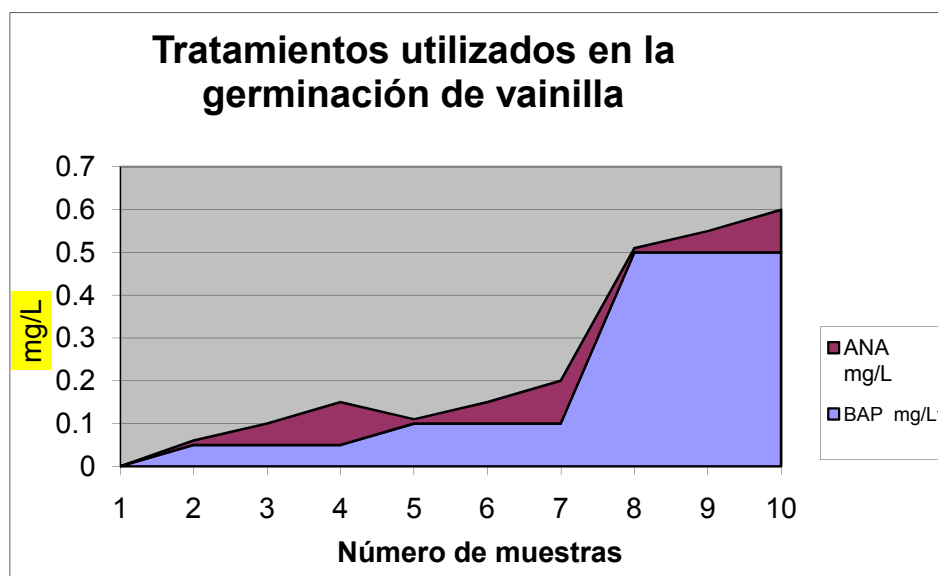


Figura 14. Tratamientos utilizados en la germinación de vainilla

### 11.8 Descripción de la unidad experimental

Las unidades experimentales las constituyeron tubos de ensayo de 25 X 150 mm en los que se colocó una semilla por cada unidad experimental, a cada tubo de ensayo se le agregó 20 ml de medio de cultivo.

### 11.9 Factores a evaluar

Los factores que se sometieron a evaluación fueron las concentraciones hormonales de BAP y ANA que se detallan en el cuadro 8.



**Cuadro 8 Concentraciones de reguladores de crecimiento utilizados en la germinación in vitro de semillas de *Vanilla planifolia***

<b>FACTORES</b>	<b>CONCENTRACION mg/L</b>		
<b>Bencíl amino purina</b>	0.05	0.1	0.5
<b>Ácido naftalanacético</b>	0.01	0.05	0.1

### **11.10 Variables de respuesta**

Para establecer un control sobre la respuesta de la germinación de las semillas se determinaron las siguientes variables de respuesta.

- ❖ Porcentaje de oxidación de la semilla por la presencia de fenoles. Algunos géneros de orquídeas presentan oxidación de las semillas esto por la presencia de fenoles, debido que no se tienen datos acerca de este aspecto se decidió tomar esta variable, para ello se tomó el porcentaje de oxidación de las unidades experimentales.
- ❖ Contaminación. Se tomó la cantidad de unidades experimentales contaminadas por hongos y/o bacterias y se expresó en porcentaje del total de unidades experimentales.
- ❖ Porcentaje de germinación. Para cada unidad experimental se observó y anotó el número de semillas que germinaron.
- ❖ Tiempo de germinación de las semillas. Para cada unidad experimental se observó los días en que las semillas germinaron.

### **11.11 Análisis de la información**

De acuerdo a las características de la investigación se realizó un análisis descriptivo debido a que no fue factible aplicar parámetros estadísticos, sólo estadística descriptiva (10). Para ello se detalló en forma precisa cada evento realizado y los cambios que ocurrieron en dicho experimento, para poder cumplir con los objetivos planteados en la investigación. Se estableció la respuesta de la especie vegetal en diferentes combinaciones de reguladores Bencil amino purina (BAP) y Acido naftalanacético (ANA) que mejor favorecieron a la germinación de semilla de *Vanilla planifolia* Andrews.

## **12. RESULTADOS**

### **12.1. Presencia de fenoles en la germinación de la semilla**

De acuerdo a los monitoreos constantes se observó que no existió la presencia de fenoles que afectaran el proceso de germinación de las semillas. Sin embargo se observó la presencia de sustancias café-anaranjadas que podrían confundirse con oxidación o con bacterias, luego de analizarlas por medio de la prueba de extracción de aceites realizada en laboratorio se concluyó que ocurrió por sustancias propias de la semilla, más específicamente Vainillina.

Los resultados de esta variable indicó que en comparación con otras especies de orquídeas como las del genero *Cattleya*, estas no sintetizan alcoholes que perjudiquen la germinación de las semillas (2).

### **12.2. Contaminación de la semilla con microorganismos perjudiciales**

De las 1000 unidades experimentales cinco unidades presentaron la presencia de microorganismos (hongos), por lo que la inmersión de la vaina en alcohol etílico al 70% por 30 segundos y en cloro al 3% por 60 segundos, con sus respectivos lavados en agua estéril favoreció la desinfección de las vainas de vainilla. Por lo que el porcentaje de contaminación se redujo a un 0.5% (5 muestras), de contaminación del total de las unidades experimentales, además la presencia de la contaminación pudo ocurrir por una mala desinfección de los instrumentos al momento de la siembra.

### 12.3. Porcentaje y tiempo de germinación

Para el **porcentaje** de germinación de la semilla se observó cada unidad experimental y se procedió a tomar nota en el momento en que estas presentaron el inicio de germinación, para ello se detallan los cuadros 9, 10 y 11. El promedio de **días a la germinación** de las semilla es de 70 días, se observó que no todas las semillas responden a la germinación al mismo tiempo, esto puede atribuirse a la existencia de inhibidores en las mismas, sin embargo las semillas de vainilla difieren a otros géneros de orquídeas como Cattleyas, Lycastes, las cuales presentan solamente un embrión sin ninguna estructura que las recubre (testa) contrariamente las de vainilla presentan una estructura dura que recubre el embrión lo cual no permite el intercambio de soluciones nutritivas que favorezcan su germinación (1).

**Cuadro 9. Resultados obtenidos en la germinación de semillas de *Vanilla planifolia* Andrews, a los 58, 60, 65, 66, 70, 73 y 75 días después de sembradas las semillas *in vitro*.**

Tratamientos	Combinación Hormonal		Semillas germinadas	% de semillas	Estado	Días a la germinación
	BAP mg/L	ANA mg/L				
1	0.0	0.0	0	0 %	Sin germinar	0
2	0.05	0.01	15	15.0 %	Inicio de la germinación	70
3	0.05	0.05	11	11.0 %	Inicio de germinación	58
<b>4</b>	<b>0.05</b>	<b>0.1</b>	<b>6</b>	<b>6.0 %</b>	<b>Inicio de germinación</b>	<b>75</b>
5	0.1	0.01	8	8.0 %	Inicio de germinación	60
<b>6</b>	<b>0.1</b>	<b>0.05</b>	<b>57</b>	<b>57.0 %</b>	<b>Inicio de germinación</b>	<b>66</b>
7	0.1	0.1	0	0 %	Sin germinar	0
8	0.5	0.01	10	10.0 %	Inicio de germinación	73
9	0.5	0.05	9	9.0 %	Inicio de germinación	65
10	0.5	0.1	0	0 %	Sin germinar	0
			116	Total de semillas germinadas		

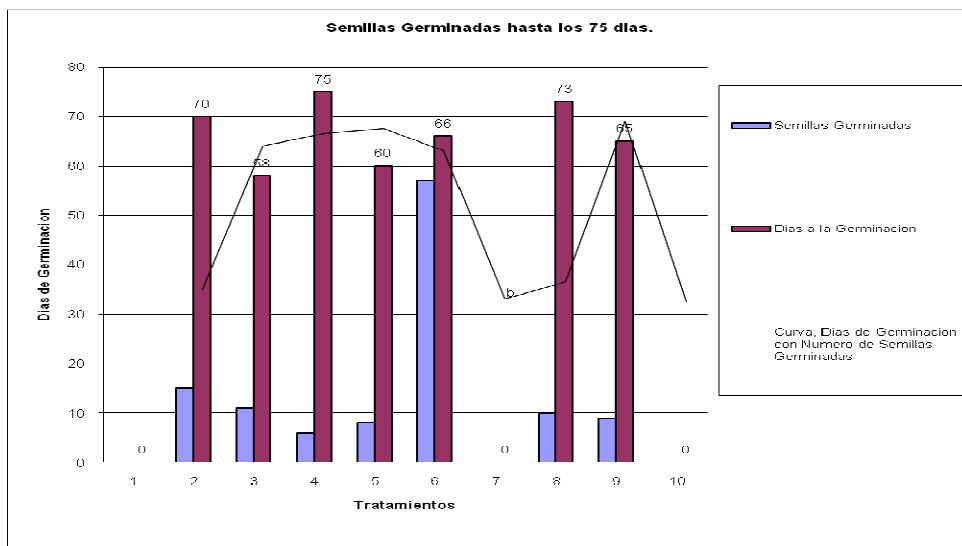


Figura 15. Semillas germinadas vrs días de germinación

El cuadro 9 y la Figura 15 demuestran que la germinación de semillas de *Vanilla planifolia* fue muy lenta, por lo que en la primera lectura se obtuvo un porcentaje de germinación del 57 % de semillas germinadas en el tratamiento 6 al cual le corresponde la combinación hormonal de 0.1 mg/L de BAP + 0.05 mg/L de ANA, que necesitó de 66 días para estimular la germinación, le siguió el tratamiento 2 con un 15 % de germinación al cual le corresponde la combinación hormonal de 0.05 mg/L de BAP + 0.01 mg/L de ANA.

En el tratamiento 3 (0.05 mg/L de BAP + 0.05 mg/L de ANA) se obtuvo un 11% de germinación siendo el tratamiento que menos días (58 días) necesitó para la germinación de las semillas (el mas rápido pero con bajo porcentaje de germinación). En el tratamiento 8 donde la respuesta fue de un 10.0 % al cual le corresponde la combinación hormonal de 0.5 mg/L de BAP + 0.01 mg/L de ANA necesitó 73 días para la germinación. El tratamiento 9 (0.5 mg/L de BAP + 0.05 mg/L de ANA) obtuvo un 9 % de semillas germinadas esto a los 65 días después de sembradas las semillas, el tratamiento 5 (0.1 mg/L de BAP + 0.01 mg/L de ANA) se observaron 8 semillas germinadas con un 8 % de germinación y el tratamiento que menos porcentaje de semillas germinadas presentó fue el 4 (0.05 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de ANA) con un 6 % de germinación y fue el tratamiento que mas días (75) necesitó para germinar.

**En los tratamientos 7, 10 y el testigo no existió ninguna semilla germinada, probablemente el tiempo en el cual responden para germinación, no ha sido suficiente por lo que se continuó observándolas hasta los 205 días.**

**Cuadro 10. Resultados obtenidos en la germinación de semillas de *Vanilla planifolia* Andrews, a los 118, 120, 126, 135, 145, días después de sembradas las semillas *in vitro*.**

Tratamientos	Combinación Hormonal		Semillas germinadas	% de Germinación	Estado	Días a la germinación
	BAP mg/L	ANA mg/L				
1	0.0	0.0	0	0 %	Sin germinar	0
2	0.05	0.01	18	18.0 %	Germinadas	145
3	0.05	0.05	13	13.0 %	Germinadas	118
4	0.05	0.1	7	7.0 %	Germinadas	135
5	0.1	0.01	8	8.0 %	Germinadas	126
<b>6</b>	<b>0.1</b>	<b>0.05</b>	<b>67</b>	<b>67.0 %</b>	<b>Germinadas</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>2</b>	<b>2.0 %</b>	<b>Germinadas</b>	<b>120</b>
8	0.5	0.01	13	13.0%	Inicio de germinación	135
9	0.5	0.05	9	9.0 %	Germinadas	120
10	0.5	0.1	4	4.0 %	Germinadas	120
			141 semillas germinadas			

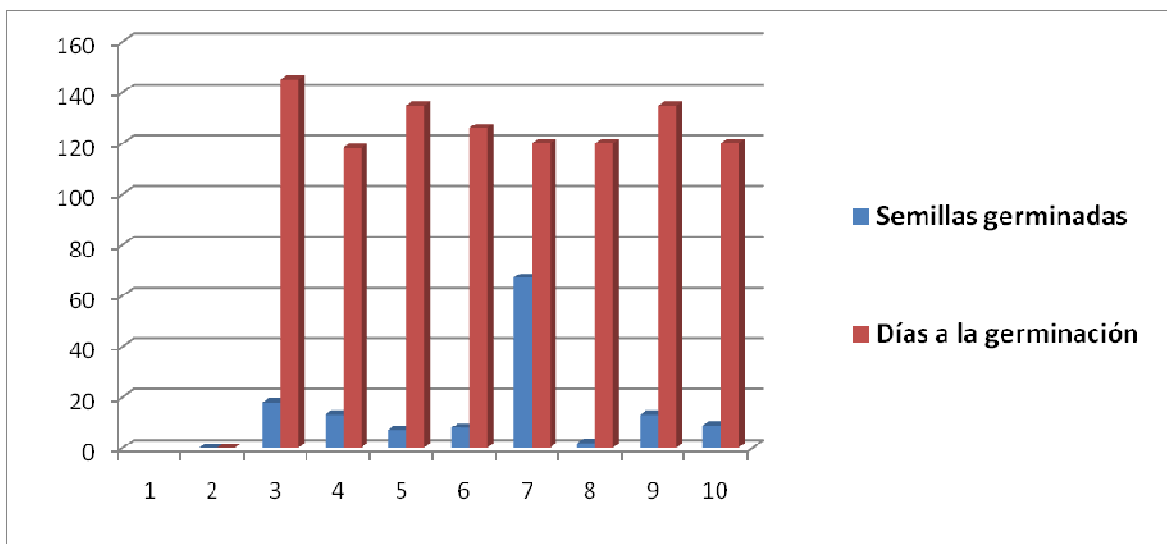


Figura 16. Días de germinación y número de semillas germinadas hasta los 145 días.

El cuadro 10 y la Figura 16 muestran que después de 120 días, se incrementó el número de semillas germinadas, en el tratamiento 6 (0.1 mg/L de BAP + 0.05 mg/L de ANA) se observó el aumento en 10 unidades más, las cuales presentaron germinación de semillas por lo que el porcentaje aumentó a un 67 %.

Para el tratamiento 2 (0.1 mg/L de BAP + 0.01 mg/L de ANA) de un 15.0 % aumentó a un 18% esto debido a que el número de semillas que respondieron fue muy escasa en este tratamiento.

En el tratamiento 3 (0.05 mg/L de BAP + 0.05 mg/L de ANA) aumentó a un 13 % de germinación. En los tratamientos 5, 8 y 9 no existió aumento de semillas germinadas por lo que los porcentajes no cambiaron. El tratamiento 4 (0.05 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de ANA) aumento de un 6 % a un 7% de germinación. En el tratamiento 10 (0.5 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de ANA) se observó que respondieron 4 semillas a la germinación por lo que se

obtuvo un 4% de germinación esto a los 120 días después de sembradas en el medio de cultivo, y el tratamiento en donde se observó menos germinación fue en el 7 (0.1 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de ANA), posiblemente esta escasa respuesta de germinación se deba a la combinación de reguladores de crecimiento ya que se observa que a medida que aumenta la concentración, la respuesta es escasa.

En el tratamiento que no se observó respuesta alguna fue en el testigo esto se debe a que no existió regulador de crecimiento que indujera a la germinación de las semillas. De todos los tratamientos se obtuvieron 141 semillas germinadas en los nueve tratamientos que presentaron respuesta.

**Cuadro 11. Resultados obtenidos en la germinación de semillas de *Vanilla planifolia* Andrews, a los 178, 180, 186, 195, 205 días después de sembradas las semillas *in vitro*.**

Tratamientos	Combinación Hormonal		Semillas germinadas	% de germinación	Estado	Días a la germinación
	BAP mg/Lt	ANA mg/Lt				
1	0.0	0.0	0	0 %	No germinaron	0
2	0.05	0.01	18	18 %	<b>Ya no germinaron</b>	<b>205</b>
3	0.05	0.05	13	13.0 %	Ya no germinaron	178
4	0.05	0.1	7	7.0 %	Ya no germinaron	195
5	0.1	0.01	8	8.0 %	Ya no germinaron	186
6	0.1	0.05	73	73 %	<b>Si germinaron</b>	<b>180</b>
7	0.1	0.1	2	2.0 %	<b>Ya no germinaron</b>	<b>180</b>
8	0.5	0.01	13	13 %	<b>Ya no germinaron</b>	<b>195</b>
9	0.5	0.05	9	9.0 %	Ya no germinaron	180
10	0.5	0.1	6	6 %	Sin germinar	180
			149 semillas germinadas			



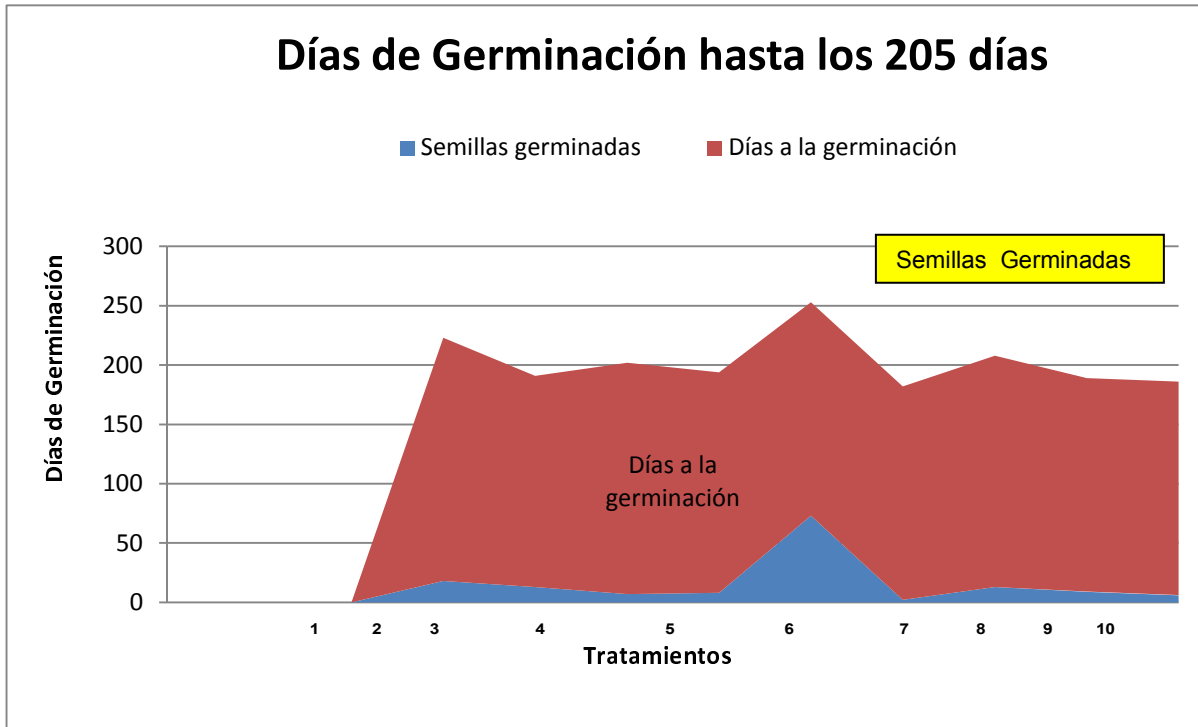


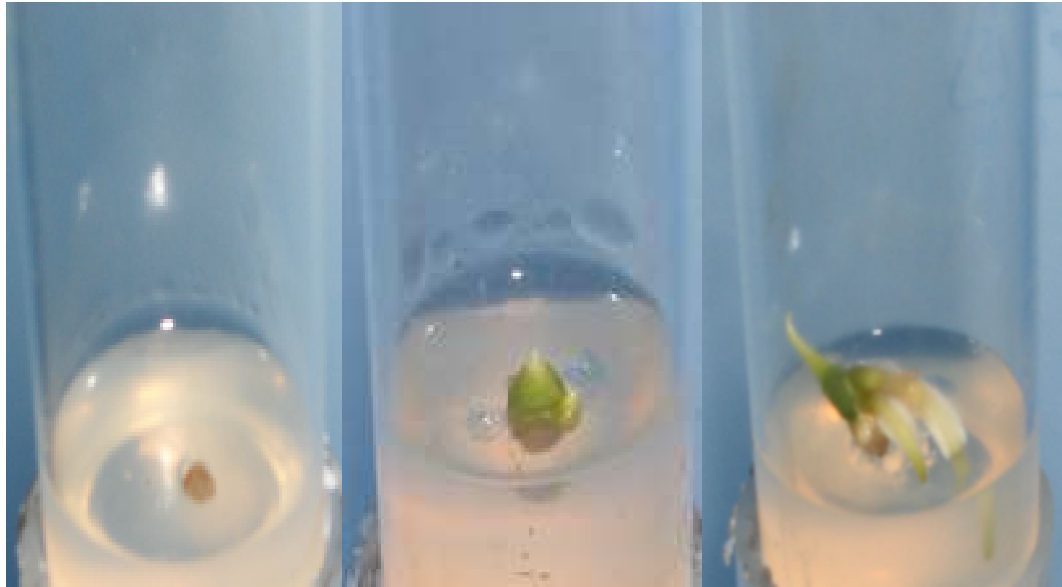
Figura 17. Días de germinación hasta los 205 días

El cuadro 11 y la figura 17 demuestran que después de 180 días, se incrementó el número de semillas germinadas.

En el tratamiento 6 (0.1 mg/L de BAP y 0.05 mg/L de ANA) se observó el aumento en 6 unidades más que presentaron germinación, por lo que el porcentaje aumentó a un 73 %.

Para el tratamiento 2 (0.1 mg/L de BAP y 0.01 mg/L de ANA) ya no existió ningún aumento en cuanto a la germinación y de igual forma pasó con el resto de tratamientos, a excepción del tratamiento 10 (0.5 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de ANA) donde aumento a un 6 % de germinación.

De los tratamientos que presentaron respuesta, el 6 fue el menor, y en el tratamiento testigo ninguna semilla germinó. Al finalizar la tercera lectura se obtuvo un total de 104 semillas germinadas lo que representó igual número de plantas.



1

2

3

FIGURA 18. Fases del desarrollo *in vitro* de vitroplántulas de *Vanilla planifolia*, 1) semilla germinando, 2) protocormo formado, 3) formación de tallo y raíz.

### 13. **Discusión de resultados de las variables, presencia de fenoles, contaminación de la semilla, porcentaje de germinación y tiempo de germinación de las semillas.**

La presencia de **Fenoles** en la germinación de la semilla de vainilla fue cero, lo cual indica que no existió oxidación en el proceso de germinación.

Los compuestos fenólicos clasificados como metabolitos secundarios de las plantas, son aquellos productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo, y la característica química de contener al menos un grupo fenol (un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional hidróxilo) en su estructura molecular (14).

Existen fenoles simples los cuales están relacionados a la reacción de la semilla de vainilla en el proceso de germinación *in vitro*, como lo son los derivados del ácido benzoico (el esqueleto es un anillo aromático unido a un carbono), son formados a partir de fenilpropanoides a los que se les adicionan dos carbonos de la cadena propánica por ejemplo la vainillina (sustancia obtenida en el proceso de germinación *in vitro* de la vainilla) (2).

El resultado de la contaminación de la semilla fue de 0.05%, este es un margen aceptable dentro de la investigación y no es significativa en los resultados.

No existieron organismos perjudiciales en excesiva cantidad en la investigación como para poder tomarlos en cuenta y decir que influyeron en la germinación de las semillas de vainilla.

A pesar de que se encuentran bajo condiciones controladas, las variables de respuesta demuestran que el proceso de germinación de semillas de vainilla es muy complejo.

El **porcentaje** de la germinación de las semillas en general fue baja; sin embargo, el 73 % de germinación con el tratamiento 6, fué el tratamiento que presentó un mayor porcentaje de germinación. El tratamiento que presentó menos semillas germinadas fue el tratamiento 7 con un 2.0 % de germinación.

El tratamiento testigo no presentó semillas germinadas con lo cual se demuestra que deben existir reguladores de crecimiento para estimular la germinación.

El período (tiempo en días) para la germinación es largo, observándose a los 58 días la primera semilla que inició el proceso de germinación. Algunas de las concentraciones bajas de reguladores utilizados promovieron la germinación; **sin embargo vale la pena evaluar otras dosis y/o combinaciones con el fin de encontrar alguna que mejore el porcentaje de germinación.**

En cuanto al bajo porcentaje de germinación se debe a la acción de sustancias inhibidoras que no permiten una germinación adecuada, o bien podría deberse a las concentraciones del medio utilizado; sin embargo, esto no puede aseverarse hasta realizar pruebas, que permitan aumentar al 100 % la germinación de estas semillas. Sin embargo, la cantidad de semillas germinadas es aceptable debido que a partir de estas se puede aumentar el número de plantas a través de propagación *in vitro* de las mismas, aspecto que en la repoblación natural no es factible.

Los resultados demuestran que no son consistentes y no muestran un comportamiento escalonado como sería lo lógico y natural esperarlo; se sugiere uniformizar la semilla y no usar de una sola vaina para un tratamiento específico.

## 14. CONCLUSIONES

1. Con la combinación hormonal de 0.1 mg/L de BAP + 0.05 mg/L de ANA se obtuvo con un 73% de germinación el cual fue el más alto.
2. El medio de Cultivo Murashige Skoog 1,962 al 100 % resultó ser adecuado en la germinación de las semillas de *Vanilla planifolia* Andrews.
3. El promedio del tiempo de germinación de las semillas de *Vanilla planifolia* Andrews fue de 67 días.
4. Las semillas de *Vanilla planifolia* Andrews no presentaron presencia de fenoles.
5. Se considera que el porcentaje de contaminación de las semillas es muy bajo (0.5%), observándose una mínima presencia de microorganismos (hongos y/o bacterias).
6. Uno de los éxitos del trabajo es la baja contaminación de la semilla (5%), gracias al buen manejo desde la cosecha, el traslado y la buena práctica de laboratorio.

## **15. RECOMENDACIONES A PARTIR DE LA INVESTIGACIÓN:**

1. Evaluar combinaciones hormonales alrededor de 0.1 mg/L de BAP + 0.05 mg/L de ANA en medio de cultivo MS (Murashige Skoog 1,962).
2. Evaluar concentraciones de hormonas de enrizamiento.
3. Trasladar las plántulas ya enraizadas a invernadero para el inicio de su aclimatación.
4. Trasladar al hábitat natural de la vainilla para investigar la adaptación de estas plantas.
5. Validar la presente investigación replicando el presente estudio.

## 16. BIBLIOGRAFÍA

1. Ames, O; Stewart C, D. 1952. Orchids of Guatemala. Chicago, US, Chicago Natural History Museum. v. 26, no. 1, p. 54-60.
2. Archila Morales, EE. 2000. Manual de propagación de orquídeas *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 87 p.
3. Argueta Ventura, EL. 2001. Efecto de dos reguladores osmóticos en la conservación *in vitro* de diez clones de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 86 p.
4. Baltasar, HJ. 1999. Diagnóstico del cultivo de vainilla como alternativa en comunidades cafetaleras de Oaxaca, Veracruz y Puebla. Chapingo, México, Universidad Autónoma Chapingo. 130 p.
5. Biocity.es. 2002. Hormonas vegetales (en línea). España. Consultado 12 mayo 2003. Disponible en [biocity.iespana.es/biocity/Fisveg/fv8.htm](http://biocity.iespana.es/biocity/Fisveg/fv8.htm)
6. Cabrera G, C. 1996. La reforestación en Guatemala. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 26 p. (Cuadernos Chac no. 2).
7. Closal, LM; Cueva Baldovino, RM. 1998. Cultivo *in vitro* (en línea). España, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola de Lleida, Departamento de Horticultura, Botánica y Jardinería, Unidad de Fisiología Vegetal. Consultado 14 mayo 2002. Disponible en [www.etsea.udl.es/invitro/indice/htm](http://www.etsea.udl.es/invitro/indice/htm)
8. Congreso hispano luso de fisiología vegetal, eco fisiología del cultivo *in vitro* (6, 1999, España). 2000. Trabajos presentados. Ed. por Sánchez Tamez, R. Oviedo. España, Universidad de Oviedo. 4 p.
9. Correll, DS. 1944. Vanilla: its history, cultivation and importance. Lloydia 7:236-264.
10. Curso de cultivo de tejidos (2, 1987, CR); Curso regional sobre el cultivo de tejidos en café. Turrialba, Costa Rica, IICA. p. 22-80.
11. Dressler, RL. 1981. The orchids: natural history and classification. Cambridge, US, Harvard Univ. Press. 412 p.
12. Dressler, RL. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Portland, Oregon, Dioscorides Press. 328 p.

13. Dressler, RL; Chase, M. 1995. Whence the orchids? p. 217-226. *In* Rudall, PJ; Ribb, PJ; Cutler, DF; Humphries, CJ (eds.). Monocotyledons: systematic and evolution. Kew, Royal Botanic Gardens. 296 p.
14. Geetha, S; Shetty, A. 2000. *In vitro* of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. Current Sciencie 79(6):886-889.
15. Giridhar, P; Reddy O, B; Ravishankar, AG. 2001. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andrews. Current Sciencie 81(6):1166-1170.
16. Hartmann, H; Kester, DE. 1980. Propagación de plantas, principios y prácticas. Trad. Antonio Marino Ambrosio. 2 ed. México, CECSA. 814 p.
17. Hernández Gonzáles, CM. 1999. Respuesta de cultivares de aguacate (*Persea americana* Mill) Fuerte y Booth 7, al cultivo *in vitro* de yemas axilares. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 122 p.
18. Hernández Tecu, MA. 2000. Respuesta de la planta medicinal zarzaparrilla (*Smilax moranensis* Martens & Galioti) al cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 122 p.
19. Herrera H, JG; Barreras S, A. 2002. Manual de procedimientos, análisis estadístico de experimentos pecuarios. México, Editorial Mexicana de Impresos. 117 p.
20. Holdridge, LR. 1982. Ecología basada en zonas de vida. Trad. por Humberto Jiménez Saa. San José, Costa Rica, IICA. 216 p.
21. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, ES). 2002. Laboratorio de cultivo de tejidos; cultivo de tejidos (en línea). España. Consultado 15 mayo 2002. Disponible en: <http://www.inia.org.uy/investigacion/biotecnologia/cultivos.htm>
22. Kanji, U. 1995. Cultivo de embriones de melocotón *in vitro*; informe final de las actividades realizadas desde mayo 1994, hasta septiembre 1996. Guatemala, ICTA. p. 24-35.
23. Kyle, L; Kley, J. 1996. Plants from test tubes an introduction to micro propagation. 3 ed. Hong Kong, Timber Press. 240 p.
24. Llinas, VM. 2000. El género vanilla (correspondencia personal) (info@ticorquideas.com). Costa Rica, Asociación Costarricense de Orquideología.



25. López Tun, LF. 2006. Distribución, abundancia y variabilidad del género *Vanilla* en el municipio de Ixcán, departamento de Quiché. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 57 p.
26. Maldonado Cáceres, MR. 1984. El cultivo y propagación de las orquídeas en Guatemala, cuidados culturales. Tesis Ing. Agr. Guatemala, URL. 172 p.
27. Maldonado, O; Tavico, O; Navas, O. 1999. Las áreas silvestres de Guatemala, ¿tienen amenazas?: estrategia nacional para la conservación y uso sostenible de la biodiversidad. Guatemala, CONAMA, Estrategia Nacional de Biodiversidad. 59 p.
28. Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
29. Rainforest, US. 2002. Medios de cultivo para tejidos vegetales *in vitro* (en línea). US. Consultado 15 mayo Disponible en [geocities.com/rainforest/andes/3026/medios.htm](http://geocities.com/rainforest/andes/3026/medios.htm)
30. Sánchez Pérez, WR. 2001. Efecto de la cinetina (CIN), bencilamino purina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) sobre la regeneración de plantas *in vitro* a partir de tejido no diferenciado de arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 122 p.
31. Vaides Arrué, CA. 1986. Algunos aspectos sobre las orquídeas. Guatemala, DIGESA. 20 p.
32. Validación de dos sistemas de producción intensiva de vainilla y transferencia tecnológica. 2002. Veracruz, México, Juan Hernández Hernández. 10 p.

### **CAPÍTULO III**

SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS  
VEGETALES DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE  
SAN CARLOS DE GUATEMALA.

## 17 INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de contribuir al mantenimiento del banco de germoplásma de los árboles de aguacate variedades Hass y Both 8 y de las plantas de crisantemo variedades Standar blanco amarillo, Shasta blanca amarilla, Polar blanco amarillo, se les brindó el mantenimiento que consistió en el cambio de los medios en los cuales se estaban cultivando, según la necesidad que estos presentaron, se realizó cada dos meses, al hacerlo, se observaron a las plántulas con mas vigorosidad lo cual contribuyó a la propagación de los brotes *in Vitro* tanto de las variedades de aguacate y crisantemo antes mencionadas.

Se implementó un aclimatizador y así tener un lugar apropiado para las plantas provenientes del laboratorio ya que se contaba con una mala aclimatación en las mismas, provocando estrés y hasta la muerte, repercutiendo esto en gastos económicos.

## **18. SERVICIO No. 1**

### **MANTENIMIENTO DE BANCO CLONAL DE DOS VARIEDADES DE AGUACATE (Hass y Both 8)**

#### **18.1 Objetivo general**

Mantener óptimo el germoplásta de aguacate para sus estudios posteriores.

#### **18.1.2 Objetivo específico**

Tratar de incrementar el número de clones de aguacate para tener así plántulas nuevas y sanas.

#### **18.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

1.1 A continuación se presenta el listado de materiales utilizados:

Medio *Murashige and Skoog* (1000 ml de solución)

- Se tomó un beacker de 1000 ml, a este se le agregó 500 ml de agua desmineralizada.
- Se le agregaron los macro nutrientes representados en el cuadro No.12, luego se le agregaron los micros nutrientes representados en el cuadro No.13.
- Se agregó el ANA (ácido naftalanacético) a razón de 2000 mg/L
- Se agitó sobre el hootplayer para homogenizar la solución.
- Se aforó hasta llegar a 1000 ml siendo esta la cantidad deseada.
- Se midió el pH de la solución siendo ésta 5.5 la cual es la permitida.
- Se le agregaron 7 grs/1000 ml de agar a la solución.
- Se calentó la solución para disolver el agar en baño de maría.
- En cada tubo de ensayo se agregó 5 ml del medio preparado.

- Se taparon con papel aluminio.
- Se rotuló cada medio de cultivo.
- Se colocó en autoclave a 120 C por 20 minutos.
- Se almacenó en el cuarto a frío a 25 C para su posterior uso.

A continuación se describe la metodología utilizada para el traslado de las plántulas de aguacate en sus diferentes variedades:

- Utilizando las sales minerales del medio *Murashige* and *Skoog* se elaboraron los medios de cultivo los cuales se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos.
- En la campana de flujo laminar y con la ayuda de pinzas estériles se realizaron los subcultivos de aguacate en sus diferentes variedades a los medios de cultivo nuevos.
- La cantidad total de transplantes en los medios de cultivo fue de 55 unidades variedad Hass, 45 unidades de aguacate variedad Both 8.
- Los subcultivos se colocaron en cuarto de incubación a una temperatura de 24°C +/- 1 durante dos meses y luego se repitió el proceso descrito anteriormente.

Cuadro No.12 Componentes de macro nutrientes  
Murashige y Skoog en 1000 ml.

Sustancia	Peso (grs.)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	23.1
KNO <sub>3</sub>	26.6
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	5.18
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.38

Cuadro No.13 Componentes Micro nutrientes A del medio nutritivo Murashige y Skoog en 1000 ml.

Sustancia	Peso (grs.)
	MICRO A a 1000X
MnSO <sub>4</sub> . (4H <sub>2</sub> O)	2.23
ZnSO <sub>4</sub> . (7H <sub>2</sub> O)	0.86
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.025

### 18.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Se transfirieron a medios de cultivo nuevos 2 clones de aguacate seleccionados, siendo estos Hass y Both 8, codificados con la clave: Hs, (Hass) y Bt (Both 8). Estos fueron transplantados cada 60 días para evitar su degradación y/o muerte.
- Es necesario hacer esta práctica cada dos meses (60 días) ya que el medio de cultivo va perdiendo sus propiedades tanto de fertilidad como de humedad.
- Al no realizar esta práctica se corre el riesgo de perder todo el germoplásta almacenado, echando a perder trabajos de años de investigación.



Figura 19. Clon de aguacate Hass trasplantado



Figura 20. Clones de aguacate Both 8 *in Vitro*.



Figura 21. Cuarto de incubación.



Figura 22. Enraizamiento de aguacate Hass.



#### 18.4 CONCLUSIONES

Los clones responden y sobreviven en medios de cultivo nuevos, por lo que es posible su sobre vivencia para los estudios posteriores y así no perder el germoplásma ya obtenido anteriormente.

Es posible incrementar el número de individuos de clones seleccionados de aguacate mediante la transferencia a cultivos nuevos, dándonos como resultado individuos más vigorosos y de mejor crecimiento.

#### 18.5 RECOMENDACIONES

Con el fin de realizar menos subcultivos de los clones seleccionados de aguacate se recomienda realizar pruebas con osmoreguladores para mantener el banco de germoplásma *in vitro* durante un periodo prolongado sin realizar transferencias a nuevos medios de cultivo.

## 19. SERVICIO No. 2

### MANTENIMIENTO DE BANCO CLONAL DE CRISANTEMO (*Chrysanthemum morifolium* Ramat )

#### 19.1 Objetivo general

Mantener óptimo el germoplasma de Crisantemo para sus estudios posteriores.

##### 19.1.2 Objetivo específico

Tratar de incrementar el número de clones de Crisantemo para tener así plántulas nuevas y sanas.

#### 19.2 MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presenta el listado de materiales utilizados:

Medio *Murashige and Skoog* (1000 ml de solución)

- Se tomó un beacker de 1000 ml, a éste se le agregó 500 ml de agua desmineralizada
- Se le agregaron los macro nutrientes representados en el cuadro No.14, luego se le agregaron los micro nutrientes representados en el cuadro No. 15.
- Se agregó el ANA (ácido naftalanacético) a razón de 2000 mg/L
- Se agitó sobre el hootplayer para homogenizar la solución.
- Se aforó hasta llegar a 1000 ml siendo esta la cantidad deseada.
- Se midió el pH de la solución siendo esta 5.5 la cual es la permitida.
- Se le agregaron 7 grs/1000 ml de agar a la solución.
- Se calentó para disolver el agar en baño de maría.

- En cada tubo de ensayo se agregó 5 ml del medio preparado.
- Se taparon con papel aluminio.
- Se rotuló cada medio de cultivo.
- Se colocó en autoclave a 120 C por 20 minutos.
- Se almacenó en el cuarto a frío a 25 C para su posterior uso.

Cuadro No.14 Componentes de macro nutrientes  
Murashige y Skoog en 1000 ml.

Sustancia	Peso (grs.)
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	23.1
$\text{KNO}_3$	26.6
$\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$	5.18
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.38

Cuadro No.15 Componentes Micro nutrientes A del medio  
nutritivo Murashige y Skoog

Sustancia	Peso (grs.)
	MICRO A a 1000X
$\text{MnSO}_4 \cdot (4\text{H}_2\text{O})$	2.23
$\text{ZnSO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$	0.86
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.62
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025

A continuación se describe la metodología utilizada para el traslado de las plántulas de crisantemo en sus diferentes variedades:

- Utilizando las sales minerales del medio *Murashige* and *Skoog* se elaboraron los medios de cultivo los cuales se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos.
- En la campana de flujo laminar y con la ayuda de pinzas estériles se realizaron los subcultivos de crisantemo en sus diferentes variedades a los medios de cultivo nuevos.
- La cantidad total de trasplantes de crisantemo en los medios de cultivo fue de 25 para la variedad Standar blanco amarillo, 25 de la variedad shasta blanca amarilla y 25 unidades de la variedad Polar blanco amarillo.
- Los subcultivos se colocaron en cuarto de incubación a una temperatura de 24°C +/- 1 durante dos meses y luego se repitió el proceso a los 60 días.

### 19.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Se transfirieron a medios nuevos 3 clones de crisantemo seleccionados mencionados anteriormente, codificados con la clave: Stba (Standar blanco amarillo), Shba (Shasta blanca amarilla) y Pba (Polar blanco amarillo).
- Estos fueron transplantados cada 60 días para evitar su degradación y/o muerte.



FIGURA 23. Crisantemo variedad polar.



FIGURA 24. Crisantemo variedad standar.



FIGURA 25. Cuarto de Incubación



FIGURA 26. Enraizamiento de Crisantemo variedad Polar



FIGURA 27. Enraizamiento de Crisantemo variedad Standar

#### 19.4 CONCLUSIONES

Las diferentes variedades de crisantemo responden exitosamente en medios de cultivo nuevos, por lo que es factible su sobrevivencia.

Es posible incrementar el numero de individuos de variedades seleccionadas de crisantemo mediante la transferencia a cultivos nuevos.

## 19.5 RECOMENDACIONES

Con el fin de realizar menos sub cultivos y mantener el banco clonal de variedades de crisantemo se recomienda realizar estudios con diferentes retardadores de crecimiento para así disminuir el tiempo de traslado de los mismos.



## **20. SERVICIO No. 3**

### **IMPLEMENTACIÓN DE UN ACLIMATIZADOR**

#### 20.1 Objetivo general

Obtener un área adecuada para el traslado de las plántulas que provienen del laboratorio si que sufran estrés.

##### 20.1.2 Objetivo específico

Mantener el porcentaje de plántulas provenientes del laboratorio lo mas adecuadamente posible un área pequeña para que se desarrollen de la misma manera como si estuviesen en su habidad natural

#### 20.2 MATERIALES Y MÉTODOS

##### a. Materiales

- 06 Tubos de PVC de  $\frac{1}{2}$ ".
- 1 lb. de alambre de amarre.
- 20 yardas de Nylon blanco para cubrir la estructura de PVC
- 10 metros de hierro de  $\frac{1}{4}$ " para asegurar las bases del mini invernadero
- 1 tenaza para asegurar el nylon con la armazón de PVC

##### b. Métodos

- La estructura se formo de PVC, y alambre para tensar los arcos.
- Se trabajo a cada 1.50 mts un arco para formar la estructura.

- Utilizando nylon, se procedió a cubrir las estructuras de PVC formando un túnel a manera de construir un mini invernadero.
- Se dejaron respiraderos (ventanas) las cuales se podían levantar según la necesidad que la temperatura nos lo exigiera.
- Se procedió a llevar algunas de las especies que estaban en el laboratorio listos para el trasplante en bolsas de almacigo.

### 20.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se construyó un aclimatizador el cual se encuentra bajo la sombra proporcionada por sarán, las plantas obtenidas del laboratorio fueron puestas bajo este aclimatizador lo cual nos proporciono un 100% de eficiencia con lo cual las plantas no se estresaron y no sufrieron daños ocasionados por el sol. El riego se hizo una vez al día para mantener la humedad de la tierra

### 20.4 CONCLUSIONES

Las plantas provenientes de laboratorio de cultivo de tejidos responden a la aclimatación bajo techo de nylon.

Se tiene que mantener un riego constante para mantener la humedad del suelo en las bolsas de almacigo.

## 20.5 RECOMENDACIONES

Se recomienda probar otros materiales sintéticos como la tela antiáfidos para comparar el efecto del endurecimiento de las plantas.

Tomar en cuenta que el presupuesto para realizar estos mini invernaderos puede variar según los materiales a utilizar para la realización del mismo.

## 21. ANEXOS

Cuadro 16. Descripción de los componentes del medio de cultivo MS (Murashige and Skoog 1,962)

COMPONENTES	CONCENTRACION mg/l MS
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	370
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	440
KH <sub>3</sub> POH	170
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	15.6
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.025
KI	0.83
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>3</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> *AEDT	37.3
Biotín	-
Ácido Fólico	-
Glicina	-
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.5